



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA OU DO
MELOXICAM SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS
DESCONGELADOS DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN

DAVID GAGO DA CÂMARA DIAS PEREIRA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR LUÍS FILIPE LOPES
DA COSTA
PROFESSORA DOUTORA LUÍSA MARIA FREIRE
LEAL MATEUS
DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS E SILVA

DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS
E SILVA

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA GONADOTROFINA CORIÓICA HUMANA OU DO
MELOXICAM SOBRE A TAXA DE GESTAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINOS
DESCONGELADOS DA RAÇA FRÍSIA HOLSTEIN

DAVID GAGO DA CÂMARA DIAS PEREIRA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

PROFESSOR DOUTOR LUÍS FILIPE LOPES
DA COSTA
PROFESSORA DOUTORA LUÍSA MARIA FREIRE
LEAL MATEUS
DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS E SILVA

DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS
E SILVA

2012

LISBOA

Ao meu Pai, minha fonte de inspiração e orgulho.

À minha Mãe, minha heroína.

Obrigado por esta preciosa herança.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o culminar de muitas horas de dedicação, esforço, trabalho, derrotas e vitórias, mas principalmente de muito apoio e palavras de confiança.

Ao Doutor João Nestor Chagas e Silva, por ter aceitado a orientação da minha tese de mestrado integrado. Pelo fornecimento dos registos, por todos os ensinamentos, pela transmissão clara de pontos de vista, pelas lições de humildade, pelos momentos de trabalho e descontração partilhados. Sem dúvida uma pessoa por quem sempre terei muita estima.

Ao Dr. Jorge Evangelista, pela sua disponibilidade, sabedoria prática e opiniões; pelos seus alertas para aspectos muito importantes da vida e da profissão. Consigo também aprendi a dar grande valor ao silêncio.

Ao Professor Doutor Ed Hoffman Madureira, por me ter concedido o estágio curricular no departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo (USP), e pelos seus excelentes conselhos e conhecimentos então transmitidos.

À Professora Doutora Isabel Neto Fonseca por me ter acudido com toda a paciência no tratamento dos dados e análise estatística dos mesmos.

Ao Professor Doutor Mário Binelli e ao Professor Doutor Reuben Mapletoft pelo fornecimento de material bibliográfico.

Ao Director Regional do Desenvolvimento Agrário, Eng. Joaquim Mário Grilo Pires, à Dra. Ana Carina Coimbra, à Eng. Ana Luísa Pavão e ao Eng. Hélder Bettencourt, agradeço a oportunidade de estágio e apoio na ilha Graciosa.

À Mariana, minha namorada, melhor amiga e companheira, pessoa fundamental no meu dia-a-dia pessoal e profissional. A tua presença é determinante para o meu sucesso e bem-estar. Obrigado por toda a compreensão e, acima de tudo, por me auxiliares no meu aperfeiçoamento.

Também a toda a sua família agradeço, principalmente à sua mãe, Maria Leonilde, por ter sido determinante num sem fim de situações.

Ao meu irmão Bernardo, pelos seus braços sempre abertos e por ter acompanhado de perto todas as minhas alegrias, frustrações e desabafos. Obrigado por tudo. Aos meus restantes irmãos, Matilde, João, Rafael, Nuno e Rui, que torcem todos os dias por mim à distância e à Ana Isabel pela ajuda na correcção ortográfica do documento.

Aos meus irmãos fora de casa, Gonçalo, Jorge Alonso, Ruben, Ricardo e Roberto. Por compreenderem tantas vezes a minha ausência e por estarem sempre disponíveis para tudo o que pudesse necessitar.

A todos os meus grandes amigos, Cláudia, Joana, Sofia, Tânia, Teresa, Tiago, Inês e Felipe, obrigado por terem acompanhado de perto o meu crescimento todos estes anos e por significarem tanto para mim. À Telma e ao Edgar, agradeço também por me terem aberto as portas do mundo do pragmatismo e da paixão pelos Bovinos.

Às famílias Bugarim e Sousa por terem sido fundamentais em todo o meu percurso e por me receberem sempre como um do lar. Ao Sr. José Artur e ao Sr. Eduardo em especial. Todas as palavras são poucas para descrever o que significam para mim.

Aos meus amigos brasileiros, Milton, Fidel, Rómulo, Mariane, Toshiro, Zé Rodrigo, Juliane e Nishimura, e a todos os outros que me ajudaram a crescer e a sobreviver num país tão distante.

A todos aqueles que contribuíram, mesmo sem saber, para me tornar naquilo que sou hoje!

Estudo do efeito da administração da gonadotrofina coriônica humana ou do meloxicam sobre a taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos descongelados da Raça Frísia Holstein

RESUMO

A transferência de embriões (TE) - tecnologia reprodutiva de 2ª geração possui um sucesso comprovado, tendo actualmente uma expressão mundial significativa. O objectivo deste trabalho consistiu no estudo das taxas de gestação (TG) após transferência de embriões bovinos descongelados, usando gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou o anti-inflamatório não esteróide, meloxicam, em novilhas da raça Frísia Holstein pertencentes a produtores de quatro ilhas do grupo central da Região Autónoma dos Açores.

Apesar da amostra estudada ser reduzida (n=100), os resultados das TG parecem-nos aceitáveis para todos os grupos: grupo não tratado (n=48) (64,6%); grupo meloxicam dia 6 (n=15) (66,6%); grupo meloxicam dia 14 (n=19) (63,2%); grupo hCG dia 6 (n=18) (55,5%). Contudo, os dados não evidenciaram diferenças significativas entre as TG nos diferentes grupos de tratamento pelo teste exacto de Fisher bilateral, com $p=0,907$. Também não se encontrou qualquer evidência de associação entre “Grupo tratado” ou “Grupo não tratado” *versus* “Diagnóstico de gestação” pelo teste exacto de Fisher bilateral, com $p=0,837$.

Os dados também não evidenciaram diferenças entre o tempo mediano de TE (7 min) entre novilhas gestantes e não gestantes, pelo teste de Mann-Whitney U, com $p=0,850$.

Assim, apesar do estudo não revelar resultados estatísticos significativos, parece-nos admissível sugerir o uso de meloxicam como tratamento coadjuvante, sobretudo após a transferência de embriões cuja viabilidade esteja ainda mais comprometida que os embriões usados no presente trabalho.

Em conclusão, o presente ensaio poderá ser o precursor de outros a serem realizados com uma amostra maior e eventualmente com um desenho experimental mais completo. Futuros estudos poderão incluir um maior número de grupos para análise e avaliarem a eventual diferença entre tratamentos, na perspectiva da obtenção de uma relação custo-benefício favorável com recurso à transferência de embriões de alto valor genético.

Palavras-chave: Transferência de embriões; novilhas; embriões descongelados; taxas de gestação; meloxicam; hCG.

The effect of human chorionic gonadotrophin or meloxicam administration on the pregnancy rate after transfer of frozen-thawed Holstein bovine embryos to dairy heifers

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) - 2nd generation of reproductive technologies has an approved success and a significative expression worldwide. The aim of this work was to study the pregnancy rate (PR) after ET using thawed bovine embryos injecting human chorionic gonadotrophin (hCG) or the non steroidal anti-inflammatory meloxicam in a group of Holstein Frislean heifers belonging to farmers allocated in four islands of the central group of Azores autonomous region.

Despite the reduced studied population (n=100), the results in PR seem to us acceptable to all groups: Untreated group (n=48) (64,6%); meloxicam day 6 group (n=15) (66,6%); meloxicam day 14 group (n=19) (63,2%) and hCG day 6 group (n=18) (55,5%). However, the data revealed no significant differences between the PR in the different treated groups with Fisher's exact bilateral test with $p = 0,907$. There was also no evidence of an association between "Group treated" or "Untreated group" versus "Pregnancy diagnosis" with Fisher's exact bilateral test $p = 0,837$ bilateral.

The data also showed no differences between the median time of ET (7 minutes) between heifers pregnant and non-pregnant with Mann-Whitney U test with $p = 0,850$.

Thus, although the study did not reveal significant statistical results, it seems acceptable to suggest the use of meloxicam as adjuvant treatment, especially after the transfer of embryos whose viability is further more compromised than the embryos used in this study. In conclusion, the present study may be the precursor of others studies to arise new aims and results regarding a larger sample and eventually a more complete experimental design. A greater number of groups to be analyzed and evaluated to check any differences between treatments with the aim of obtaining a relationship among values appropriate to the use of embryo transfer with high genetic value.

Keywords: Embryo transfer; heifers; thawed embryos; pregnancy rates; meloxicam; hCG.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|----------|
| RESUMO..... | III |
| ABSTRACT | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VIII |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | VIII |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | VIII |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | IX |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJECTIVOS | 2 |
| RELATÓRIO DE ESTÁGIO | 3 |
| I. Beira Litoral (Aveiro) | 3 |
| II. Pirassununga – São Paulo (Brasil) | 4 |
| III. Ilha Graciosa (Região Autónoma dos Açores) | 6 |
| I. GENERALIDADES SOBRE OVULAÇÃO MÚLTIPLA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (OMTE) E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES..... | 1 |
| 1.1. NOTA HISTÓRICA..... | 2 |
| 1.2. VANTAGENS DA TE..... | 3 |
| 1.2.1. Controlo Sanitário | 3 |
| 1.2.2. Infertilidade | 3 |
| 1.2.3. Progresso genético..... | 4 |
| 1.3. FACTORES DE SELECÇÃO E MANEIO GERAL DE DADORAS E RECEPTORAS..... | 4 |
| 1.3.1. Idade | 4 |
| 1.3.2. Valor genético..... | 5 |
| 1.3.3. Condição corporal (CC), nutrição e balanço energético negativo (BEN) | 5 |
| 1.3.4. Estação do ano..... | 5 |
| 1.3.5. Lactação..... | 6 |
| 1.3.6. Profilaxia..... | 6 |
| 1.4. FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO..... | 6 |
| 1.4.1. Fisiologia do ciclo éstrico | 6 |
| 1.4.2. Programa de Superovulação (SOV) | 7 |
| 1.5. TRATAMENTOS HORMONAIS SUPEROVULATÓRIOS (TSOV) | 8 |
| 1.5.1. Hormonas SOV | 8 |
| 1.5.2. Sincronização Dadora - Receptora | 9 |
| 1.5.3. Inseminação artificial (IA) | 12 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 1.6. | PROCEDIMENTOS DE RECOLHA, AVALIAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) | 13 |
| 1.6.1. | Recolha de embriões | 13 |
| 1.6.2. | Avaliação laboratorial dos embriões | 14 |
| 1.6.3. | Transferência de embriões (TE) | 15 |
| 1.7. | CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES..... | 17 |
| 1.7.1. | Considerações gerais sobre criopreservação | 17 |
| 1.7.2. | Técnicas de congelação | 18 |
| II. | GENERALIDADES SOBRE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO (RMG) E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE E TARDIA (MEP/T) | 21 |
| 2.1. | RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO (RMG)..... | 22 |
| 2.1.1. | Período de pré-reconhecimento materno..... | 22 |
| 2.1.2. | A comunicação mãe-embrião | 22 |
| 2.1.3. | Interferão-tau bovino (bIFN- τ) | 24 |
| 2.1.4. | Prostaglandinas PGF _{2α} e PGE ₂ | 25 |
| 2.1.5. | Níveis plasmáticos de P ₄ | 26 |
| 2.1.6. | Ciclo-oxigenase (COX) | 27 |
| 2.1.7. | Concentração de estrogénio (E ₂)..... | 27 |
| 2.1.8. | Factor de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1)..... | 28 |
| 2.1.9. | Factor de necrose tumoral α (TNF- α)..... | 28 |
| 2.1.10. | Hormona do crescimento (GH) | 29 |
| 2.2. | MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE E TARDIA (MEP/T) | 29 |
| 2.2.1. | Mortalidade embrionária precoce (MEP)..... | 30 |
| 2.2.2. | Mortalidade embrionária tardia (MET) e mortalidade fetal (MF) | 31 |
| 2.2.3. | Causas de Mortalidade Embrionária (ME) e Mortalidade Fetal (MF)..... | 31 |
| III. | ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO DA TAXA DE GESTAÇÃO (EOTG) | 39 |
| 3.1. | ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO DA TAXA DE GESTAÇÃO (EOTG) | 40 |
| 3.1.1. | Criação de um corpo lúteo (CL) maior a partir do aumento de tamanho do folículo pré-ovulatório..... | 40 |
| 3.1.2. | Optimização da taxa de crescimento do CL..... | 41 |
| 3.1.3. | Estimulação da fase lútea..... | 41 |
| 3.1.4. | Atenuação da influência do folículo dominante (FD)..... | 42 |
| 3.1.5. | Aumento do estímulo antiluteolítico | 43 |
| 3.1.6. | Diminuição da resposta luteolítica materna | 43 |
| 3.1.7. | Nutrição | 43 |
| 3.1.8. | Transferência de dois embriões..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. FÁRMACOS E OUTRAS ESTRATÉGIAS COM ACÇÃO DIRECTA SOBRE A TG EM PROGRAMAS DE IA E TE..... | 44 |
| 3.2.1. Meloxicam | 44 |
| 3.2.2. Flunixinina meglumina (FM) | 45 |
| 3.2.3. GnRH | 46 |
| 3.2.4. Dispositivos intravaginais de P ₄ | 46 |
| 3.2.5. Gonadotrofina corónica humana (hCG) | 47 |
| 3.2.6. Gonadotrofina coriónica equina (eCG)..... | 47 |
| 3.2.7. Ibuprofeno | 48 |
| 3.2.8. Somatotropina recombinante bovina (rbST) | 48 |
| 3.2.9. Interferão-tau recombinante bovino (rbIFN- τ) | 49 |
| 3.2.10. Vesículas trofoblásticas (VT) | 49 |
| 3.2.11. IGF-1 | 49 |
| 3.2.12. Propilenoglicol (PPG) | 50 |
| IV. TRABALHO EXPERIMENTAL..... | 51 |
| 4.1. INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 4.2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 4.2.1. Delineamento experimental | 53 |
| 4.2.2. Análise estatística..... | 56 |
| 4.3. RESULTADOS | 56 |
| 4.3.1. Relação entre o tratamento efectuado e o DG | 56 |
| 4.3.2. Relação entre grupos tratados versus grupos não tratados e DG..... | 57 |
| 4.3.3. Relação entre o tempo de TE e o DG | 57 |
| 4.4. DISCUSSÃO..... | 58 |
| 4.4.1. Grupo tratado com hCG D6 e a melhoria da TG..... | 60 |
| 4.4.2. Grupos tratados com meloxicam (D6 e D14) e a melhoria da TG | 60 |
| 4.4.3. Tempo de TE e a TG | 62 |
| 4.4.4. Considerações finais | 62 |
| 4.4.5. Crítica | 63 |
| 4.5. CONCLUSÃO FINAL | 63 |
| V. ANEXOS..... | 64 |
| VI. BIBLIOGRAFIA | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representação gráfica do ciclo éstrico. Retirado e adaptado de Moore & Thatcher (2006). | 7 |
| Figura 2. Processo de filtração. Original do autor. | 15 |
| Figura 3. Colocação na placa de Petri. Original do autor. | 15 |
| Figura 4. Ilustração da sinalização antiluteolítica. Retirado e adaptado de Senger (2003). ... | 24 |
| Figura 5. Cirurgia correctiva. Deslocamento do abomaso. Aveiro. Original do autor | 64 |
| Figura 6. Colocação de "chin-ball" em touro Nelore. São Paulo. Original do autor | 64 |
| Figura 7. Ecografia reprodutiva em novilha Nelore. São Paulo. Original do autor | 65 |
| Figura 8. Observação de embriões à lupa. Ilha Graciosa. Original do autor..... | 65 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Resumo de actividades realizadas na primeira fase do estágio. | 4 |
| Tabela 2. Resumo de actividades realizadas na segunda fase do estágio..... | 5 |
| Tabela 3. Resumo de actividades realizadas na terceira fase do estágio. | 6 |
| Tabela 4. Causas bacterianas de mortalidade embrionária e fetal. | 34 |
| Tabela 5. Causas víricas de mortalidade embrionária e fetal. | 35 |
| Tabela 6. Causas parasitárias de mortalidade embrionária e fetal..... | 36 |
| Tabela 7. Análise descritiva da amostra relativa a idade e peso. | 53 |
| Tabela 8. Análise descritiva da amostra relativa a condição corporal (CC). | 54 |
| Tabela 9. Caracterização da população de acordo com o tipo de tratamento e respectiva TG. | 56 |
| Tabela 10. Caracterização da amostragem de acordo com o grupo de tratamento e DG. ... | 57 |
| Tabela 11. Tempo de TE. | 57 |
| Tabela 12. Taxas de gestação médias de TE in vivo. Adaptado de Thibier (2005). | 59 |
| Tabela 13. Calendário de OMTE e sincronização. Baseado no programa de OMTE realizado por Chagas e Silva (2012) na ilha Graciosa..... | 66 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Relação entre o tempo de TE e o DG..... | 58 |
|--|----|

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| ° C | Graus Celsius |
| AA | Ácido araquidónico |
| AINE(S) | Anti-inflamatório(s) não esteroide(s) |
| BCE | Boa colocação embrionária |
| BE | Benzoato de estradiol |
| BEN | Balanço energético negativo |
| BHV-1 | Herpesvírus bovino tipo-1 |
| BST | Somatotropina bovina |
| BTP-1 | Proteína trofoblástica bovina 1 |
| BVD | Diarreia viral bovina |
| CC | Condição corporal |
| CIDR | Dispositivo intravaginal de libertação controlada de progesterona (“Controlled internal drug release”) |
| CL | Corpo(s) lúteo(s) |
| Cm | Centímetro(s) |
| COX | Ciclo-oxigenase(s) |
| DG | Diagnóstico de gestação |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equina |
| E₂ | Estradiol-17 β |
| EG | Etilenoglicol |
| ET | Embryo transfer |
| FD | Folículo dominante |
| FM | Flunixinina meglumina |
| FSH | Hormona folículo-estimulante |
| GnRH | Gonadoliberina |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| IA | Inseminação artificial |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| IFN | Interferão |
| IFN-τ | Interferão tau |
| bIFN-τ | Interferão tau bovino |
| IGF | Factor de crescimento semelhante à insulina |
| IL | Interleuquina |
| LH | Hormona luteinizante |
| ME | Mortalidade embrionária |

| | |
|-------------------------|---|
| MEP | Mortalidade embrionária precoce |
| MET | Mortalidade embrionária tardia |
| MF | Mortalidade fetal |
| Min | Minuto(s) |
| mL | Mililitro(s) |
| OMTE | Ovulação múltipla e transferência de embriões |
| OT | Oxitocina |
| P₄ | Progesterona |
| PG | Prostaglandina(s) |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PGF_{2α} | Prostaglandina F ₂ alfa |
| PPG | Propilenoglicol |
| PGH₂ | Prostaglandina H ₂ |
| PR | Pregnancy rate |
| PTR | Palpação transrectal |
| RBST | Somatotropina recombinante bovina |
| RBIFN-τ | Interferão tau recombinante bovino |
| ROIFN-τ | Interferão tau recombinante ovino |
| RMG | Reconhecimento materno da gestação |
| RSOV | Resposta(s) superovulatória(s) |
| SF | Soro fisiológico |
| SOV | Superovulação |
| TCF | Transferência de embriões clonados frescos |
| TD | Transferência directa |
| TE | Transferência(s) de embriões |
| TETF | Transferência de embriões em tempo fixo |
| TNF | Factor de necrose tumoral |
| TSA | Teste de sensibilidade ao antibiótico |
| TSOV | Tratamento(s) superovulatório(s) |
| UI | Unidades internacionais |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| τ | Tau |
| ω | Ómega |
| μm | Micra |

INTRODUÇÃO

A fisiologia reprodutiva dos bovinos de leite tem sofrido alterações significativas durante as últimas décadas relacionadas com o aumento da ingestão de alimento e o aumento da produção de leite (Wiltbank, Lopez, Sartori & Sangsritavong, 2006). A transferência de embriões (TE) é uma ferramenta útil no aumento da probabilidade de concepção dos bovinos (Demetrio, Santos, Demetrio & Vasconcelos, 2007), tendo uma marcada expressão mundial e dela resultam mais de 500.000 embriões produzidos anualmente (Mapletoft & Hasler, 2005). Assim sendo, mesmo com uma acentuada especialização dos técnicos de TE, os resultados são ainda aleatórios (Durocher, Morin & Blondin, 2006), com a observação de decréscimos das taxas de gestação (TG) após TE aquando do uso de embriões descongelados (Hasler, 2001; Spell, Beal, Corah & Lamb, 2001; Chebel et al., 2008), sendo o valor destas aproximadamente 50% (Thibier, 2005). As alterações a que estão sujeitos os embriões durante os processos de congelação e descongelação são uma das explicações possíveis (Hasler, 2001; Spell et al., 2001).

A mortalidade embrionária (ME) representa, na actualidade, a maior limitação para a fertilidade num sistema de produção leiteira (Mann & Lamming, 1999; Thatcher et al., 2001a; Gordon, 2002), assumindo maior expressão durante o período de reconhecimento materno da gestação (RMG) (Thatcher et al., 2001a; Diskin & Morris, 2008; Machado et al., 2010; Lonergan, 2011; Diskin et al., 2012).

Nos bovinos, para que ocorra gestação, é necessário o estabelecimento de um conjunto de processos envolvendo a progenitora e o embrião, a sinalização da sua presença através da secreção de interferão-tau (IFN- τ), promovendo a manutenção de produção de progesterona (P_4) pelo corpo lúteo (CL) e evitando a luteólise (Mann & Lamming, 1999; Binelli et al., 2001; Mann & Lamming, 2001; Thatcher et al., 2001a).

Vários estudos foram publicados adoptando estratégias para melhoria das TG, com recurso ao uso de hormonas e outros fármacos, tanto na inseminação artificial (IA) como na TE (Hasler, 2010). Estas estratégias visam a diminuição da capacidade luteolítica da progenitora e/ou o aumento do estímulo antiluteolítico desenvolvido pelo embrião, podendo envolver manipulações das funções folicular, luteínica, uterina e do embrião e ainda do ambiente (Binelli et al., 2001; Binelli, Machado, Bergamaschi, da Silva, Ibiapina & Bisinotto, 2006). É sobre o estudo das estratégias de melhoria das TG após TE que surgiu a presente dissertação.

OBJECTIVOS

O estudo que agora se apresenta desenvolveu-se no âmbito de um dos períodos do estágio curricular do autor, bem como dos vários programas de OMTE (ovulação múltipla e transferência de embriões) desenvolvidos pelo Doutor João Nestor Chagas e Silva.

Pretendeu-se deste modo contribuir para o aprofundamento dos conhecimentos relativos a esta temática e avaliar de que forma a utilização da hCG ou do meloxicam poderia constituir uma estratégia economicamente viável, após a transferência de embriões descongelados.

Os objectivos gerais desta dissertação foram:

- Elaborar uma revisão precisa e actual da literatura sobre esta área do conhecimento, de forma a dar uma base de sustentação científica ao estudo;
- Avaliar a influência do tratamento com meloxicam ou hCG na TG subsequente à TE;
- Avaliar se poderia existir qualquer relação entre o tempo de TE e a TG.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

I. Beira Litoral (Aveiro)

O estágio curricular decorreu em três locais distintos, passando por Portugal e Brasil. A primeira parte teve início a 5 de Setembro de 2011, na Região da Beira Litoral, tendo sido finalizado a 23 desse mês. O principal objectivo prendeu-se com a possibilidade de acompanhar o médico veterinário Dr. Jorge Evangelista na sua rotina de campo, com uma intervenção na área de reprodução e obstetrícia, clínica e consultoria de bovinos leiteiros, naquela região.

Durante o estágio houve a possibilidade do autor inteirar-se do processo de controlo reprodutivo com recurso a exames ginecológicos por palpação transrectal (PTR), em diversas explorações leiteiras. Na maior parte das visitas às explorações houve a possibilidade de realizar diagnóstico de gestação (DG) de vacas primíparas, múltiparas e novilhas com 48-60 dias de gestação.

Por outro lado, o autor acompanhou o diagnóstico e prestou auxílio a cirurgias do aparelho gastro-intestinal em situações de campo. As cirurgias realizadas tiveram como objectivo a correcção de situações de deslocamento do abomaso à esquerda que, com alguma frequência, é efectuada em explorações de bovinos leiteiros de média-alta produção no período pós parto. O autor teve ainda a ocasião de acompanhar o diagnóstico de cetoses sub-clínicas, com o auxílio de um aparelho doseador de corpos cetónicos.

As consultorias a uma exploração pecuária (Promilker) no concelho de Estarreja, também foi outra das actividades acompanhadas. Teve como objectivo a secagem ou refugo de animais, para controlo da qualidade do leite. Alguns dos parâmetros observados para tomada de decisão por parte do médico veterinário foram a análise das médias de produção de leite por animal aos 305 dias, idade, número de lactações, quantidade de células somáticas presentes por mililitro (mL) de leite, contagem de microorganismos e análise de registos microbianos e testes de sensibilidade a antibióticos (TSA).

Tabela 1. Resumo de actividades realizadas na primeira fase do estágio.

| Área de intervenção | Actividades | Realizado | Observado |
|----------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|
| Reprodução Bovina | Exame ginecológico por PTR | 250 | 300 |
| | DG por PTR transrectal | 30 | 100 |
| | Quistos ováricos | 20 | 30 |
| | Endometrites | 15 | 25 |
| | Salpingites | 1 | 1 |
| | Freemartinismo | 1 | 1 |
| | Útero unicórnio | - | 2 |
| | Auxílio ao parto | 1 | - |
| Clínica / Cirurgia | Deslocamento do abomaso à esquerda | - | 3 |
| | Diagnóstico de cetoses sub-clínicas | 5 | 25 |
| Consultoria | Qualidade do leite | - | 60 |

II. Pirassununga – São Paulo (Brasil)

A segunda parte do estágio teve início a 10 de Outubro de 2011, realizou-se no campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo (USP), prolongando-se até 16 de Dezembro do mesmo ano. A USP proporcionou a possibilidade de poder trabalhar na área da reprodução com um grande número de bovinos, num curto espaço de tempo. Todas as actividades foram supervisionadas pelo Professor Doutor Ed Hoffmann Madureira e executadas para diversos ensaios experimentais da tese de doutoramento do Dr. Milton Maturana Filho, e decorreram tanto dentro do campus, no laboratório de farmacologia e endocrinologia da reprodução e no campo, como também fora das instalações universitárias, em outras explorações pecuárias (fazendas), em parceria com a instituição.

As actividades realizadas na área da reprodução, pelo autor, tiveram como base o estabelecimento de protocolos de inseminação artificial (IA) em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte *Bos Indicus* (raças Nelore e Tabapuã), avaliação ginecológica por PTR e ecografia, DG por ecografia, aspiração folicular ecoguiada, transferência de embriões clonados frescos (TCF), colocação de arreios marcadores (“chin-ball”) em toiros do campus para detecção de cios. Surgiu também a oportunidade de acompanhar o ensaio experimental da Dra. Juliane Magalhães sobre puberdade em *Bos indicus*, com a

possibilidade de prática do exame ginecológico com auxílio do ecógrafo. Houve ainda a possibilidade de observação e colocação cirúrgica de implantes subcutâneos para um ensaio experimental sobre fármacos anti-inflamatórios, a cargo do Professor Doutor José Rodrigo Valim.

Tabela 2. Resumo de actividades realizadas na segunda fase do estágio.

| Área de intervenção | Actividades | | Realizado | Observado |
|---------------------|---|----------------------|-----------|-----------|
| Reprodução Bovina | Exame ginecológico | PTR | 20 | 50 |
| | Exame ginecológico | Ecografia | 42 | 800 |
| | DG | Ecografia | 15 | 350 |
| | Patologias Reprodutivas | Quistos ováricos | 5 | 50 |
| | | Endometrites | 2 | 20 |
| | Outras observações | Infantilismo genital | - | 15 |
| | | Mumificação fetal | - | 2 |
| | | Gestação gemelar | - | 5 |
| | Colocação de dispositivos intravaginais de progesterona (P ₄) | | 150 | 600 |
| | IA | | 1 | 600 |
| | Aspiração folicular transvaginal ecoguiada | | - | 50 |
| | TCF | | - | 6 |
| | Colocação de buçais marcadores em toiros | | 2 | 5 |
| Cirurgia | Colocação de implantes subcutâneos | | 2 | 12 |
| Outros | Recolha de amostras de sangue | | 50 | 500 |

III. Ilha Graciosa (Região Autónoma dos Açores)

A terceira e última fase do estágio representa o período fundamental para o desenvolvimento e elaboração da presente tese.

Teve origem na ilha Graciosa, na Região Autónoma dos Açores. Iniciou-se a 14 de Fevereiro de 2012, tendo terminado a 6 de Março do mesmo ano. As actividades foram calendarizadas, protocoladas e supervisionadas pelo Doutor João Nestor Chagas e Silva e executadas com a coordenação da Dra. Ana Carina Coimbra e do Eng. Hélder Bettencourt.

As actividades realizadas pelo autor no programa de Ovulação Múltipla e Transferência de Embriões – OMTE, passaram pela aplicação de dispositivos intravaginais de P₄ (CIDR®) e administração de hormona superovulatória - FSH (Pluset, Laboratorios Calier, Espanha) a cinco dadoras, bem como a administração de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) a dadoras e receptoras para respectiva sincronização de estros. Nos dias de recolha, avaliação e transferência de embriões o autor prestou o apoio necessário para a condução das actividades executadas pelo Orientador e sob a supervisão do mesmo.

Tabela 3. Resumo de actividades realizadas na terceira fase do estágio.

| Área de intervenção | Actividades | Realizado | Observado |
|---------------------|--|-----------|-----------|
| Reprodução Bovina | Exame ginecológico por PTR | 5 | 60 |
| | Aplicação de hormonas superovulatórias (FSH) | 5 | - |
| | Detecção de cios superovulatórios | 5 | - |
| | Colocação de dispositivo intravaginal de P ₄ (CIDR) | 4 | 1 |
| | Recolha e avaliação de embriões | - | 5 |
| | Transferência de embriões frescos e descongelados | - | 19 |

**I. GENERALIDADES SOBRE OVULAÇÃO MÚLTIPLA E
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (OMTE) E CRIOPRESERVAÇÃO DE
EMBRIÕES**

1.1. NOTA HISTÓRICA

Por definição, a TE como tecnologia reprodutiva de 2ª geração, consiste no procedimento de remoção de um ou mais embriões do tracto reprodutivo de uma dadora, transferindo-os para o de uma ou mais receptoras (Hasler, 2004).

No actual panorama, a TE é apenas uma etapa de uma série de processos que podem incluir alguns ou todos os seguintes passos: superovulação e inseminação das dadoras, recolha dos embriões, isolamento, avaliação e armazenamento, micromanipulação e testes genéticos aos embriões, conservação e, só por fim, a própria TE (Hasler, 2004).

Em 1891, Walter Heape foi responsável pela primeira TE bem sucedida em lagomorfos.

A 15 de Março de 1930 Hartman e seus colaboradores contribuíram decisivamente no sentido da TE ser aplicável às espécies pecuárias (Betteridge, 2003). Dois anos mais tarde, foi registada a primeira TE em espécies pecuárias (Warwick, Berry & Horlacher, 1934, citados por Betteridge, 2003). Na espécie bovina, a primeira TE data de 1949 e foi realizada por Umbaugh. Como resultado deste trabalho nasce o primeiro vitelo, em 1951 (Betteridge, 2003).

No princípio da década de 70 a TE começa a crescer como forma de actividade comercial. Nos primeiros anos recorreu-se à cirurgia, por laparotomia na região média ventral. Técnica inapropriada para bovinos leiteiros, como observou Hasler (1992). Quando usada por técnicos experientes, a TE cirúrgica mantém-se provavelmente como a que produz melhores TG (70%). No entanto, a técnica não-cirúrgica é a eleita, não só por ser economicamente viável, como também por ser mais sensível em termos de bem-estar animal (Gordon, 2002). Durante aquela década foram assinaláveis os desenvolvimentos nos procedimentos de recolha e TE não cirúrgicos e criopreservação de embriões (Seidel & Seidel, 1981).

Em 1983 foi investigado pela primeira vez o potencial benefício de protocolos de OMTE para o melhoramento genético de bovinos de leite (Nicholas & Smith, 1983).

Actualmente, tornou-se um negócio de escala mundial e dela resultam mais de 500.000 embriões produzidos anualmente de vacas superovuladas (Mapletoft & Hasler, 2005). Em Portugal, no ano 2010, o número de embriões recolhidos e transferidos *in vivo*, foi 488 e 319, respectivamente, tendo em consideração que apenas uma das 5 equipas de TE legalizadas apresentou dados para publicação (Knijn, 2011).

Em conclusão, mesmo com a acentuada especialização técnica dos utilizadores da TE, os resultados desta ainda são inesperados (Durocher, Morin & Blondin, 2006).

1.2. VANTAGENS DA TE

1.2.1. Controle Sanitário

A maior vantagem da TE é a possibilidade de transporte facilitado de genes para diferentes localizações geográficas, comparativamente ao sêmen ou a animais vivos. Esta oportunidade torna ainda possível o controle sanitário rigoroso (Senger, 2003). Assim, com o aumento das exportações de embriões, começaram a surgir questões sobre a possibilidade de transmissão de doenças (Sutmoller, 1996).

Vários estudos demonstram que os meios usados na recolha e manutenção de embriões são responsáveis pela diluição dos agentes patogénicos potencialmente perigosos. O uso da tripsina e antibióticos na composição daqueles também estão considerados (Stringfellow, 1998; Riddell & Stringfellow, 1998).

Teoricamente existem riscos de transmissão de doenças por TE mas, até à data, não foi reportada a transmissão de qualquer agente infeccioso a partir de um embrião (Thibier, 2001; Stringfellow, Givens & Waldrop, 2004).

1.2.2. Infertilidade

O contínuo melhoramento dos bovinos leiteiros nas últimas décadas levou a um aumento significativo da produção de leite (Lucy, 2001; Rodriguez-Martinez et al., 2008), consequentemente não acompanhado de um equivalente progresso na saúde e nutrição (Rodriguez-Martinez et al., 2008), aspecto que possivelmente será responsável pela diminuição da fertilidade (Lucy, 2001; Rodriguez-Martinez et al., 2008).

Existe também a possibilidade de obtenção de embriões a partir de vacas geneticamente superiores, mas infértéis, por superovulação (SOV) (Bowen, Elsdén & Seidel, 1978; Elsdén, Nelson & Seidel, 1979). Também em vacas repetidoras (“repeat-breeders”) esta tecnologia tem relativa eficácia, tendo em consideração a baixa fertilidade e mortalidade embrionária precoce (MEP) a que estes animais estão sujeitos, pois permite um incremento significativo da sua eficiência reprodutiva (Rodrigues et al., 2010).

A transferência de embriões frescos é uma ferramenta útil no aumento da probabilidade de concepção de vacas leiteiras Holstein, evitando a problemática da elevada produção de leite e das baixas concentrações de P₄ (Demetrio et al., 2007).

1.2.3. Progresso genético

A TE como técnica reprodutiva proporciona a oportunidade de aumento da descendência de animais geneticamente superiores (Galli et al., 2003), havendo a possibilidade da sua integração em programas de selecção e melhoramento, valorizando-os. Acessoriamente, poder-se-á ainda proceder à criopreservação embrionária para ulterior utilização (Moore & Thatcher, 2006).

O progresso genético como vantagem num programa bem estruturado de OMTE, pode estar associado a um aumento da intensidade de selecção e a uma redução do intervalo entre gerações (Smith, 1988; Ax et al., 2005). Porém, Nicholas (1996) refere que a consanguinidade pode aumentar substancialmente nesse tipo de programas.

Esta tecnologia é inquestionável como meio de introdução de novos genótipos em diversas populações (Evans, 1998), preservação de espécies e raças em extinção (Lopes da Costa, Chagas e Silva & Robalo Silva, 2001; Gordon, 2004), permitindo ainda a criação de bancos de embriões (Gordon, 2004).

1.3. FACTORES DE SELECÇÃO E MANEIO GERAL DE DADORAS E RECEPTORAS

A selecção de dadoras é baseada em dois critérios primordiais: mérito genético do animal, geralmente escrutinado pelo proprietário, e a sua performance produtiva. A informação sobre a capacidade reprodutiva é normalmente confirmada pelo médico veterinário (Stroud & Hasler, 2006; Farin, Moore & Drost, 2007). A escolha das dadoras é uma das mais importantes decisões na técnica de TE (Larson, 2011) e pode também envolver um prévio historial de sucesso em TE (Keller & Teeper, 1990).

1.3.1. Idade

Vários autores concluíram que a taxa de produção de embriões viáveis por parte de novilhas é inferior à das vacas (Hasler, McCauley, Schermerhorn & Foote, 1983; Mollo, Lora, Faustini, Romagnoli & Cairoli, 2007). Relativamente à qualidade embrionária, vacas leiteiras em produção apresentam uma maior percentagem de embriões de pior qualidade, comparado com novilhas do mesmo tipo de aptidão (Leroy, Opsomer, De Vliegher, Vanholder & Gossens, 2005). Hasler (2010) verificou que vacas superovuladas produzem poucos embriões quando atingem 8 a 10 anos de idade.

A idade da receptora é determinante na fertilidade, obtendo-se TG superiores em novilhas, quando comparadas com vacas (Hasler, 2001; Stroud & Hasler, 2006; Mollo et al. 2007; Rodrigues, 2011).

1.3.2. Valor genético

As fêmeas dadoras devem ser de valor genético superior (Mapletoft, 2006; Larson, 2011), ter um historial de boa fertilidade e superioridade relativamente a caracteres de importância económica (Mapletoft, 2006), de forma a justificar os custos da TE (Mapletoft, 2006; Larson, 2011).

Seleccionar animais com alto valor genético como progenitores poderá ser realizado com testes de performance, testes de descendência e análise de pedigree (Seidel Jr & Seidel, 1991).

1.3.3. Condição corporal (CC), nutrição e balanço energético negativo (BEN)

O bom manejo nutricional das dadoras é crítico para a produção de embriões viáveis. Esta preocupação envolve a gestão da condição corporal (CC), crucial para a reprodução (Seidel Jr & Seidel, 1991; Ealy, Drost & Hansen, 1993; Stroud & Hasler, 2006; Farin et al., 2007; Larson, 2011). Idealmente, as recolhas embrionárias deverão ser feitas após o pico de lactação, quando o balanço energético negativo (BEN) não se observa ou quando está mais controlado (Larson, 2011).

Vacas excessivamente gordas são tidas como fracas dadoras por revelarem, frequentemente, uma resposta superovulatória (RSOV) fraca e, também, por terem um aparelho genital de difícil manipulação transrectal (Seidel Jr & Seidel, 1991).

A receptora, por seu turno não deve entrar no programa gorda, mas sim a ganhar 100 a 200 gramas por dia (Farin et al., 2007). A tendência para vacas com melhor CC revelarem melhores TG por TE reitera a importância de se ter uma boa gestão do manejo nutricional da exploração pecuária (Wallace et al., 2011).

1.3.4. Estação do ano

A estação do ano tem algum significado na eficácia da superovulação (SOV) em climas temperados (Hasler, 2010a). Os problemas atmosféricos prolongados ou tempestades durante a SOV e processo de sincronização poderão comprometer os resultados do programa de TE (Hasler, 2010a).

O recurso à TE como forma de melhorar os índices de fertilidade no Verão, pode ter por base a produção e congelação de embriões nos meses mais frios do ano, quando não há influência das altas temperaturas ambientais, e depois a sua transferência no verão (Ealy et al., 1993; Hasler, 2001; Lucy, 2002; Hansen, Jousan & Block, 2004). Tanto novilhas como vacas leiteiras em lactação tendem a ter menores TG após TE durante o período estival

(Sartori, Sartor-Bergfelt, Mertens, Guenter, Parrish & Wiltbank, 2002; Chebel, Demétrio & Metzger, 2008).

1.3.5. Lactação

Vários autores concluíram não haver qualquer correlação entre o número de embriões obtidos após tratamento superovulatório e a produção leiteira (Santos, Thatcher, Pool & Overton, 2001; Hasler, 2006; Chebel et al., 2008).

1.3.6. Profilaxia

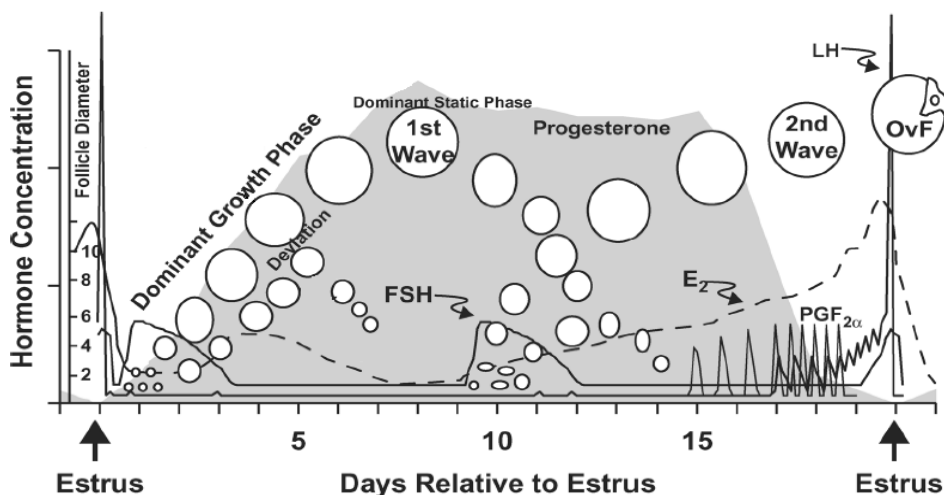
As dadoras e receptoras devem ser vacinadas para as doenças abortivas mais comuns (Farin et al., 2007), desparasitadas e dever-se-á fazer igualmente uma colheita de sangue para pesquisa de antígeno anti-BVD, para identificação e eliminação de animais persistentemente infectados (Chagas e Silva, 2009).

1.4. FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO

1.4.1. Fisiologia do ciclo éstrico

O ciclo éstrico dos bovinos é composto por duas a três ondas de desenvolvimento folicular (Pierson & Guinther, 1984; Adams, 1994; Bó, Adams, Pierson & Mapletoft, 1995; Moore & Thatcher, 2006). Cada onda é composta por uma sucessão de fases: recrutamento; selecção; dominância e atresia. O recrutamento folicular ocorre sempre, com intervalos de oito a dez dias, durante o ciclo éstrico. Um pico de FSH promove o recrutamento dos folículos e um deles é seleccionado, começando o seu crescimento até 8,5 mm de diâmetro. Este continua em crescimento linear, enquanto que os folículos subordinados entram em atresia (Moore & Thatcher, 2006). Este processo é, em parte, resultado da produção de estradiol (E_2) e inibina pelos folículos emergentes, suprimindo a FSH circulante por *feedback* negativo e prevenindo também a emergência de uma nova onda (Adams, Kot, Smith & Guinther, 1993; Bó, Adams, Caccia, Martinez, Pierson & Mapletoft, 1995; Mapletoft et al., 2002; Moore & Thatcher, 2006). O folículo dominante (FD) adquire mais receptores para LH nas células da granulosa do que os subordinados, o que lhe permite o crescimento contínuo (Adams, Jaiswal, Singh & Malhi, 2008). Caso estejam presentes concentrações elevadas de P_4 , o FD entra em atresia. Por outro lado, poderá ovular espontaneamente caso haja regressão do CL (Moore & Thatcher, 2006). Depois de cada ovulação, uma nova onda folicular é iniciada com alguns folículos a serem recrutados (Perry, 2004).

Figura 1. Representação gráfica do ciclo éstrico. Retirado e adaptado de Moore & Thatcher (2006).



1.4.2. Programa de Superovulação (SOV)

Os tratamentos superovulatórios (TSOV) na vaca têm como principal objectivo a obtenção de um número máximo de embriões transferíveis, com alta probabilidade de induzir gestações (Mapletoft, 2006). Através da manipulação hormonal do ciclo reprodutivo da fêmea bovina dadora é possível produzir embriões a partir de fêmeas geneticamente superiores, permitindo a transferência para receptoras com mérito genético reduzido (Moore & Thatcher, 2006).

Assume-se que, na totalidade das fêmeas superovuladas, a média de embriões transferíveis por tratamento é de 5 (Hasler, 2003; Hasler, 2006).

Existe ainda uma crescente evidência em vários estudos que se no começo do TSOV estiver presente um FD a RSOV é reduzida (Guibalt, Grasso, Lussier, Rouillier & Matton, 1991; Fortune, 1994; Lussier, Lamothe & Pacholek, 1995; Farin et al., 2007). No entanto, Maciel et al. (1995) concluíram que este factor não é limitante para uma boa RSOV. A sincronização da emergência de uma nova onda folicular, previamente ao TSOV, pode ser obtida mecanicamente, promovendo a ablação do FD (Bergfelt, Bó, Mapletoft & Adams, 1997; Adams, 1999; Mapletoft & Bó, 2012). Sendo uma técnica com aplicabilidade e com resultados aceitáveis, requer perícia por parte do técnico (Bungarts & Niemann, 1994; Bó et al., 1995; Bergfelt et al., 1997; Galli et al., 2003; Farin et al., 2007). Farmacologicamente, podem ser usadas hormonas, com o objectivo de induzir a luteinização ou a ovulação, como a GnRH (gonadoliberina) ou pLH (Hormona luteinizante porcina) (Bó et al., 1995; Pursley,

Mee & Wiltbank, 1995; Martinez, Adams, Bergfelt, Kastelic & Mapletoft, 1999), mas nem sempre o uso desta estratégia se demonstrou eficiente (Martinez et al., 1999).

O uso de FSH exógena com aquele fim também está descrito, promovendo-se a dominância por parte dos folículos subordinados (Adams, 1999). Rajamahendran e Calder (1993) recorreram à gonadotrofina coriônica humana (hCG) mas não obtiveram bons resultados. A aplicação de E₂ exógeno também é uma estratégia válida, pois promove a atresia dos folículos antrais (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002). Contudo o uso deste último não está legalizado em muitos países (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002) devido às suas possíveis propriedades cancerígenas (Lyytinen, Pukkala & Ylikorkala, 2009) . Dados de um relatório da FAO indicaram que níveis máximos de E₂ permanecem na carne de novilhas pelo menos até 30 dias após uma administração (Ingerowski, Scheutwinkel-Reich & Stan, 1981).

1.5. TRATAMENTOS HORMONAIS SUPEROVULATÓRIOS (TSOV)

1.5.1. Hormonas SOV

1.5.1.1. Hormona folículo estimulante (FSH)

Existe a evidência de que a RSOV é mais consistente com FSH do que com eCG (Elsden, Nelson & Seidel, 1978; Monniaux, Chupin & Saumande, 1983; Lopes da Costa et al., 2001; Gordon, 2002). No entanto, outros autores não encontraram diferenças entre as duas hormonas (Goulding, Williams, Roche & Boland, 1996, citados por Mapletoft et al., 2002). Devido ao seu tempo de semi-vida de 5 horas (ou menos), a hormona tem de ser injectada por via intramuscular duas vezes ao dia (Monniaux et al., 1983), num regime de 4 a 5 dias, em doses decrescentes (Alkemade, Murphy & Mapletoft, 1993; Mapletoft et al., 2002). O resultado deste tratamento é muito variável. Aproximadamente um terço das dadoras não responde ao TSOV (Greve, Callesen, Hyttel, Høier & Assey, 1995), um terço produz em média 1 a 3 embriões viáveis e apenas um terço tem uma boa RSOV capaz de produzir um grande número de embriões (Boland, Goulding & Roche, 1991).

É considerado relevante o facto das quantidades de FSH e LH (rácio FSH:LH), nas preparações comerciais, influenciarem a RSOV (Boland et al., 1991; Kelly, Duffy, Roche & Boland, 1997; Mapletoft & Bó, 2012).

A necessidade de administração de FSH duas vezes por dia requer constante disponibilidade pessoal e aumenta a possibilidade de erro durante o manuseamento do fármaco. Para além disso, duas manipulações dos animais por dia pode causar stress e diminuir a RSOV (Bó, Hockley, Nasser & Mapletoft, 1994). Uma única administração subcutânea de FSH demonstrou produzir uma RSOV equivalente ao protocolo de duas administrações diárias, durante 4 dias (Bó et al., 1994). Os resultados obtidos com o

tratamento com uma única injeção intramuscular de FSH diluída em ácido hialurónico foram altamente eficientes em bovinos de carne (Tribulo et al., 2011).

1.5.1.2. Gonadotrofina coriónica equina (eCG)

A eCG é uma complexa glicoproteína com dupla actividade, FSH e LH. (Murphy & Martinuk, 1991). O seu tempo de semi-vida é de 40 horas (Dieleman, Bevers, Vos & de Loos, 1993; Mapletoft, Steward & Adams, 2002) e a dose recomendada é 2500 UI por via intramuscular, monodose (Vos, van der Schans & de Wit, 1994; Mapletoft, 2006). Dada a duração do seu tempo de semi-vida, a RSOV é baixa (Murphy & Martinuk, 1991), devido à contínua estimulação ovárica, presença de folículos anovulatórios, perfis endócrinos anormais e redução da qualidade embrionária (Moor, Kruij & Green, 1984). Foi sugerido que este contínuo crescimento folicular se deve ao aumento dos níveis de estrogénios, levando à criação de um ambiente uterino hostil (Gonzalez, Wang, Carruthers, Murphy & Mapletoft, 1994b; Greve et al., 1995).

1.5.1.3. Anti – eCG

Está descrita a possibilidade de formação de anticorpos por parte da eCG (Gordon, 2002). De forma a inverter as consequências directas da longevidade da eCG, pode recorrer-se à administração intravenosa de anticorpos anti-eCG na altura da primeira inseminação, 12 horas após o início do cio (Dieleman et al., 1993; Gonzalez, Wang, Carruthers, Murphy & Mapletoft, 1994a; Mapletoft, 2006). Quando tratados com eCG e anticorpos anti – eCG, os animais apresentaram maior quantidade de CL e embriões viáveis do que aqueles tratados exclusivamente com eCG (Gonzalez et al., 1994b).

Os anticorpos anti-eCG não estão, actualmente, disponíveis comercialmente, impossibilitando o seu uso (Mapletoft, 2006).

1.5.2. Sincronização Dadora - Receptora

1.5.2.1. Finalidade

A sincronização entre a idade do embrião e o ciclo éstrico da receptora tem demonstrado afectar a taxa de sucesso da TE (Hasler, 2001; Mapletoft, 2006) e a aplicação prática de um intervalo de ± 24 horas de assincronia entre a dadora e a receptora é notória (Hasler, 2001; Mapletoft, 2006). A sincronia deve ser considerada porque o embrião e os tecidos uterinos maternos estabelecem entre si uma complexa rede de comunicação, envolvendo uma componente secretória por parte de ambos. Estas secreções estimulam e modulam os estádios precoces da gestação (Gordon, 2002).

A selecção de receptoras pode ser realizada por detecção de cio espontâneo ou após sincronização com fármacos (Mapletoft, 2006). Existe a crescente evidência que as TG após TE são reduzidas caso não seja respeitada a assincronia igual ou inferior a 24 horas (Spell et al., 2001; Hasler, 2001). Não há registo de maior ou menor sensibilidade à assincronia por parte de embriões descongelados quando comparados com embriões frescos (Hasler, 2001).

1.5.2.2. Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ou análogos de síntese

A $PGF_{2\alpha}$ tem sido o fármaco mais utilizado para sincronização de cio em bovinos (Bó et al., 2002; Stroud & Hasler, 2006; Suadsong, 2011; Mapletoft & Bó, 2012). A acção da $PGF_{2\alpha}$ é luteolítica, promovendo o encurtamento da fase lútea, com o pressuposto da presença de um CL funcional (Macmillan, 2010). Num esquema de administração com um intervalo de 10 a 11 dias entre doses o objectivo é que esta actue no meio do ciclo éstrico, o que teoricamente implica que todas as vacas tenham um CL funcional no momento da segunda administração (Mapletoft, 2006). No entanto, foram observadas melhores TG quando o intervalo foi de 14 dias (Folman, Kaim, Herz & Rosemberg, 1990, citados por Mapletoft 2006).

A maturidade do CL no momento do tratamento com $PGF_{2\alpha}$ influencia a resposta luteolítica (Momont & Seguin, 1984). Esta PG não induz efectivamente a luteólise nos primeiros 5 a 6 dias após o cio (Suadsong, 2011), facto explicado principalmente: pela imaturidade do CL naquele período e a ausência de receptores específicos (Bó et al., 2002); pelo intervalo de tempo com baixos níveis endógenos de P_4 entre as duas injeções (Macmillan, 2010); pelo estágio de desenvolvimento do FD no momento do tratamento (Kastelic & Ginther, 1991 citados por Bó et al., 2002).

A aplicação deste fármaco a fêmeas possuidoras de um CL maduro detectado por PTR poderá resultar numa maior proporção de animais com resposta positiva ao tratamento, mas erros na avaliação do CL e falhas na detecção de cio levam a que apenas em 75% de animais tratados sejam registados os cios (Gaines, 1994 citado por Suadsong, 2011). As TG após TE são normalmente mais elevadas quando os animais são tratados com $PGF_{2\alpha}$ depois do 12º dia do ciclo (Mapletoft, 2006).

1.5.2.3. Dispositivos intravaginais de P_4 e $PGF_{2\alpha}$

A utilização de dispositivos de P_4 aumenta a possibilidade de sincronização quando comparada à administração de $PGF_{2\alpha}$ (Bó et al., 2002).

Segundo vários autores, os tratamentos com progestagénios, quando usados por tempo suficientemente longo (≥ 14 dias), provocam a regressão do CL e resultam na sincronização do cio, com a agravante de poderem reduzir a fertilidade (Bó et al., 2002).

As doses de progestagêneos utilizadas têm relativo efeito supressivo sobre a secreção de LH, quando comparado com uma fase lútea normal, e podem estar associada a desenvolvimentos desproporcionais de tamanho do FD. Tratamentos que induzem a regressão de folículos persistentes resultam na emergência de novas ondas de crescimento folicular e melhoram as TG (Bó et al., 2002).

Se aos protocolos de sincronização com $\text{PGF}_{2\alpha}$ for associado um dispositivo intravaginal de P_4 , nos 5 dias que antecedem a segunda administração da PG, o número de animais em cio e as TG aumentam devido à manutenção de níveis elevados de P_4 (Macmillan, 2010).

1.5.2.4. Estradiol, P_4 , GnRH e eCG

Concluiu-se, em vários estudos, que o estradiol age como supressor dos folículos antrais (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002) actuando directamente sobre a FSH (Bó, Adams, Pierson, Tribulo, Caccia & Mapletoft, 1994).

O protocolo mais comum em programas de IATF, para sincronizar uma nova onda folicular, envolve: a administração intramuscular no dia 0, de 2,5 ou 5 mg de estradiol-17 β , bem como de 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) combinado com a aplicação pela mesma via de administração de 50 mg de P_4 , no momento da inserção de um dispositivo intravaginal de P_4 (Bó et al., 2002). No dia 7 é removido o dispositivo de P_4 e aplicada $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo administrado novamente no dia 8, 1 mg de BE. Uma vez metabolizado o E_2 , dá-se um pico de FSH, acompanhado de uma nova onda folicular aproximadamente 4 dias depois (Bó et al., 1995).

A maior parte dos estudos realizados indica que a administração combinada de eCG num programa de sincronização com um dispositivo de P_4 e E_2 exógeno, para uma TE em tempo fixo (TETF), resulta no aumento da TG (Bó, Peres, Cutaia, Pincinato, Baruselli & Mapletoft, 2012). Apesar dos seus efeitos benéficos, as preparações comerciais de E_2 não estão disponíveis em muitos países (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002), como já referido anteriormente.

O protocolo de tratamento que utiliza GnRH e $\text{PGF}_{2\alpha}$ para IATF em bovinos é normalmente denominado de “Ovsynch” (Pursley et al., 1995). Consiste na injeção de GnRH seguida de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 dias depois. A segunda injeção de GnRH é administrada 48 horas depois do tratamento com $\text{PGF}_{2\alpha}$ e com a IA a ter lugar 16 horas depois (Pursley et al., 1995; Brusveen et al., 2008). Foi ainda demonstrado que este protocolo não é tão eficaz em novilhas como em vacas, porque nem sempre ocorre ovulação do FD e consequente emergência de nova onda após a injeção de GnRH (Bó et al., 2002; Martinez, Kastelic, Adams, Cook, Olson & Mapletoft, 2002).

Com a aplicação de um dispositivo de P_4 desde o momento da primeira administração de GnRH até à injeção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ evita-se a lise do CL antes da injeção da $\text{PGF}_{2\alpha}$, o que tem

como consequência directa a exibição de cio e ovulação após o final do tratamento (Bó et al., 2002).

1.5.3. Inseminação artificial (IA)

Depois do TSOV e sincronização a dadora deve ser observada atentamente de forma a reconhecerem-se nela sinais de cio. Por vezes, quando comparadas com o grupo não tratado, vacas superovuladas não demonstram sinais tão claros de comportamento de cio e 10% das dadoras nunca mostram indícios de cio (Seidel Jr & Seidel, 1991). O tempo em que a dadora é vista em cio aberto é definido pela exibição do reflexo de imobilização – RI ou “standing heat” e é o ponto de referência para a IA (Seidel Jr & Seidel, 1991; Stroud & Hasler, 2006). No caso do uso de sémen congelado a IA deve ser feita no período de 12 horas (Stroud & Hasler, 2006) a 24 horas (Seidel Jr & Seidel, 1991) depois do início do cio. Martinez et al. (2004) concluíram que, caso a dadora seja inseminada durante o estro, o resultado será uma maior quantidade de embriões do sexo feminino e se, pelo contrário, a IA se realizar mais tarde, levará à obtenção de uma maior quantidade de machos. Num estudo realizado por Pellegrino, Henry, Jacomini e Diniz (2003) relacionou-se a capacitação espermática com o controlo fisiológico do sexo do embrião. Observou-se que a característica de selecção do sexo do embrião podia ocorrer no ambiente uterino, considerando que os espermatozóides com cromossoma Y se capacitariam mais cedo após a inseminação, dada a sua maior sensibilidade à concentração iónica do útero quando comparados com os espermatozóides com cromossoma X. Contudo, Pugh et al. (1999) consideraram que ao inseminar num momento mais distante da ovulação existia a possibilidade de se ter mais espermatozóides capacitados com cromossoma Y e, assim, estes não sobreviveriam até a chegada do oócito, sendo então o mesmo fertilizado por espermatozóide com cromossoma X.

1.6. PROCEDIMENTOS DE RECOLHA, AVALIAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)

1.6.1. Recolha de embriões

1.6.1.1. Considerações iniciais

As técnicas não-cirúrgicas de recolha são preferíveis às cirúrgicas, por não danificarem o tracto reprodutivo e por permitirem a utilização repetida da dadora (Mapletoft, 2006).

O primeiro passo é o exame ginecológico por PTR, para estimar o número de CL presentes (Seidel Jr & Seidel, 1991; Farin et al., 2007). Processo difícil, caso haja uma grande RSOV. Mesmo quando o técnico contabiliza apenas 2 a 3 CL à palpação, ocasionalmente são recolhidos 4 a 5 embriões. Contudo, é muito raro obterem-se embriões quando não existem estruturas palpáveis (Seidel Jr & Seidel, 1991).

1.6.1.2. Preparação da dadora e do material de recolha

A dadora deve ser colocada numa estrutura de contenção. Após a remoção das fezes do recto, o número de CL deve ser estimado (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007). A região perineal e lábios vulvares devem ser limpos, secos e a cauda da dadora colocada fora do alcance do técnico (Mapletoft, 2006).

A anestesia epidural é recomendada na recolha não-cirúrgica de embriões, injectando-se 5-10 ml de lidocaína a 2% no espaço entre a 1ª e a 2ª vértebras coccígeas (Gordon, 2002; Farin et al., 2007), evitando-se a defecação e o desconforto do animal (Farin et al., 2007). Realiza-se previamente a tricotomia da zona e assegura-se a assépsia (Seidel Jr & Seidel, 1991; Gordon, 2002).

O instrumento básico na recolha é o cateter de Foley com balão insuflável (Seidel Jr & Seidel, 1991; Hasler, 2004). Antes da sua remoção do envelope protector o sistema de ar do balão deve ser testado (Seidel Jr & Seidel, 1991) e o cateter lavado com meio de recolha. Deverá ainda inserir-se no seu lúmen o mandril, previamente esterilizado, de uma cânula de IA (Seidel Jr & Seidel, 1991; Farin et al., 2007).

1.6.1.3. Recolha não-cirúrgica de embriões

A utilização deste tipo de cateter é prática corrente na recolha entre 6º e o 8º dia após o cio (Hasler, 2004; Farin et al., 2007). As opiniões dividem-se em relação ao local de colocação deste (Hasler, 2004). No caso de se pretender a recolha com localização no corpo do útero, o balão é insuflado imediatamente após o cérvix, o que permite a lavagem dos dois cornos uterinos em simultâneo. Pelo contrário, pretendendo-se a lavagem de cada corno individualmente, o catéter deve ser inserido profundamente no corno, instilando e recolhendo o meio. Após a sua finalização, repete-se o processo no corno contralateral

(Hasler, 2004). Castro Neto, Sanches, Binelli e Seneda (2005) obtiveram uma maior quantidade de embriões quando os dois cornos foram lavados em simultâneo.

Após a colocação do catéter e insuflação do balão com 10 a 15 mL de ar, o mandril é retirado. O meio de recolha é instilado e recolhido através de um sistema de tubagens ligadas por uma junção em “Y” (Farin et al., 2007). Deverá ter-se em atenção a quantidade de ar a insuflar devido à forte possibilidade de ruptura do endométrio (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007).

A quantidade de meio de recolha necessária à lavagem é de aproximadamente 1000 mL, posicionando-se a embalagem a 1 metro de altura acima do aparelho genital (Farin et al., 2007) fazendo-se o circuito por gravidade (Hasler, 2004). Repleto de solução, o corno uterino é gentilmente massajado e o meio contendo os embriões deslocado através do catéter, para o frasco destinado à recolha, sendo o fluxo de solução direccionada directamente para o fundo (Grimes, 2008). Uma segunda lavagem uterina aumenta em 30 % a quantidade de embriões recolhidos, caso se realize 24 horas após a recolha inicial (Subramaniam, Devarajan & Mohanan, 1991). Como o comprovaram Castro Neto et al (2005), este tempo pode ser reduzido para 30 minutos.

O meio de recolha comumente usado neste tipo de intervenção é uma solução salina de tampão fosfatado (PBS) e há várias combinações disponíveis para a confecção dos meios de recolha e de manutenção (Farin et al., 2007). Actualmente eles estão disponíveis comercialmente (Mapletoft, 2006).

No final da recolha geralmente é administrada PGF_{2α} ou um análogo de síntese à dadora, evitando-se gestações indesejáveis (Farin et al., 2007; Chebel et al., 2008).

1.6.2. Avaliação laboratorial dos embriões

1.6.2.1. Manuseamento dos embriões

Após a recolha, deverá proceder-se à filtração do conteúdo do frasco colector com um filtro com poros de 50-70 µm de diâmetro (Chagas e Silva, 1991; Mapletoft, 2006), (tipo EM-COM) (Chagas e Silva, 1991).

Figura 2. Processo de filtração. Original do autor.



Figura 3. Colocação na placa de Petri. Original do autor.



1.6.2.2. Avaliação embrionária

Um importante aspecto na TE, com grande impacto no estabelecimento e manutenção da gestação, reside na correcta avaliação da qualidade embrionária (Hamilton et al., 2012).

Para classificação embrionária é necessária uma ampliação à lupa estereoscópica de 50 a 100X (Hasler, 2001; Mapletoft, 2006), com os embriões dispostos numa pequena placa de Petri (Mapletoft, 2006). O diâmetro total do embrião bovino é de 150 – 190 μm incluindo a zona pelúcida de 12 – 15 μm , permanecendo o tamanho relativamente inalterado desde estágio de uma célula até ao estágio de blastocisto (Mapletoft, 2006). O estágio de desenvolvimento e qualidade daqueles estão descritos por Stringfellow e Seidel (1998) no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

A qualidade embrionária é muito importante em programas de TE porque se reflete directamente na TG após TE (Abe, Matsuzaki & Hoshi, 2002).

1.6.3. Transferência de embriões (TE)

Aqueles embriões que forem seleccionados como sendo viáveis e com qualidade para serem transferidos são mantidos no meio de manutenção, à temperatura do laboratório, enquanto não são transferidos para as receptoras. Outra opção é a sua preparação para a congelação, secção (“splitting”) ou para uma técnica mais específica como a biópsia para a sexagem.

Alternativamente, os embriões poderão ser refrigerados em meio de transferência por 24h sem perda de viabilidade. A manipulação embrionária por microcirurgia é praticada por

poucas equipas comerciais de TE. O número de embriões a ser transferidos pode ser duplicado com apenas uma ligeira redução da TG. Contudo, as técnicas de congelação de embriões manipulados ainda necessitam de melhoria (The Merck Veterinary Manual Online, 2012).

O embrião a ser transferido é previamente aspirado, em ambiente de laboratório, para o interior de uma palhinha de 0,25 mL, mantido entre duas colunas de ar e duas colunas de meio (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007).

A TE só resultará em elevadas TG se a sincronização do estro entre dadora e receptora for adequada (Mapletoft, 2006).

Devido à susceptibilidade do útero na fase lútea deverá ser evitada a sua contaminação. Após evacuação das fezes do recto e identificação do ovário com o CL procede-se à anestesia epidural baixa e limpeza da zona perineal (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007).

A palhinha é então inserida e encurtada de forma ajustada no “pistolet” de TE e uma baínha de TE é colocada e adaptada ao mesmo instrumento de TE. É aconselhável o uso de camisa sanitária a cobrir o “pistolet”. Depois da passagem deste pela vagina e em contacto com o orifício cervical posterior é recolhida a camisa sanitária, podendo iniciar-se a entrada no canal cervical. Cuidadosamente, deverá procurar-se o corno uterino ipsilateral ao CL e colocar o embrião de forma suave (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007) no terço anterior do corno uterino (Farin et al., 2007) ou no terço médio (Mapletoft, 2006), enquanto se retira gentilmente o “pistolet” do aparelho reprodutor (Mapletoft, 2006; Farin et al., 2007).

Existe uma correlação negativa entre o tempo de manipulação do cérvix e cornos uterinos e a TG (Selk, 2004; Farin et al., 2007), o que sugere que o trauma no endométrio é um factor limitante (Mapletoft, 2006). Assim, caso haja lesão do endométrio durante a progressão com consequente hemorragia, o embrião provavelmente não sobreviverá (Seidel Jr & Seidel, 1991; Selk, 2004; Mapletoft, 2006).

1.6.3.1. Embriões frescos versus embriões descongelados

A congelação dos embriões reduz em 8,5 a 14 % a TG, comparativamente aos embriões frescos. Esta redução deve-se provavelmente a alterações nas células trofoblásticas causados pelos processos de congelação e descongelação (Hasler, 2001; Spell et al., 2001; Chagas e Silva, Lopes da Costa & Robalo Silva, 2002; Galli et al., 2003; Chebel et al., 2008). Tais alterações podem reduzir o crescimento embrionário e promover uma baixa secreção de interferão-tau (IFN- τ). Segundo Senger (2003), existe uma correlação positiva entre a produção de P₄ pela receptora e a síntese daquele IFN pelo embrião, sendo possível afirmar que altas concentrações de P₄ possam melhorar mecanismos antiluteolíticos em embriões congelados (Marques et al., 2011).

1.7. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

1.7.1. Considerações gerais sobre criopreservação

A TE não tem de ser obrigatoriamente o processo final. Há ainda a possibilidade de se proceder à congelação dos embriões excedentários (Moore & Thatcher, 2006; Saragusty & Arav, 2011) pelo método convencional (congelação lenta usando etilenoglicol - EG) ou por vitrificação, assegurando assim o armazenamento e a melhor gestão dos recursos genéticos (Saragusty & Arav, 2011). Estes são dois processos consideravelmente diferentes, mas com relações físico-químicas semelhantes (FAO, 2010).

Com a criopreservação o metabolismo celular é mantido em estado de quiescência para que o mesmo possa ser restabelecido, mais tarde após descongelação e TE. Para que o embrião possa retomar o seu desenvolvimento normal é necessário o armazenamento a baixas temperaturas, induzindo a interrupção da actividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, o que possibilita a conservação de células por tempo indeterminado (Gordon, 1994).

Assim, a criopreservação proporciona o transporte genético à escala global, permite a preservação de germoplasma durante períodos alargados de tempo e contribui para o aumento da pressão de selecção genética de um efectivo (Makarevich et al., 2010).

Considerando que os embriões são constituídos essencialmente por água, é determinante que estes sejam adequadamente desidratados e sujeitos a descidas suaves de temperatura, evitando-se a formação intracelular de cristais de gelo. Uma vez iniciado o processo de arrefecimento, é importante manter uma descida unidirecional da temperatura e prevenir as oscilações (Youngs, 2011).

A indução de formação de cristais de gelo ou “seeding”, à temperatura apropriada e com o meio crioprotector (que varia quanto ao tipo e concentração) adequado, é um ponto crítico do processo (Youngs, 2011). Durante a descida da temperatura e o início da cristalização do meio extracelular, a concentração deste aumenta e o embrião responde osmoticamente, perdendo água para o meio extracelular não congelado (Mapletoft, 2006). Para evitar o congelamento intracelular os embriões devem ser arrefecidos a 1º C/minuto ou mais lentamente. Contudo, taxas de arrefecimento muito lentas conduzem a alterações celulares (Mapletoft, 2006).

Na mesma espécie e para diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, desde oócito a zigoto, e mesmo para vários estádios de clivagem, a permeabilidade varia para o mesmo crioprotector (Leibo, 2008).

Os crioprotectores são fundamentais para prevenção de alterações celulares durante a congelação e descongelação. Dividem-se em 3 grupos: o grupo dos permeáveis e de baixo

peso molecular [(metanol, EG (PM=62,1), propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO) (PM=78,2), butanediol, glicerol (PM=92,1)]; o grupo dos não permeáveis e de baixo peso molecular (galactose, glucose, sacarose); e o grupo dos não permeáveis e de alto peso molecular (polivinilpirrolidona).

Os crioprotectores permeáveis e de baixo peso molecular substituem a água intracelular das células embrionárias, por osmose, antes da congelação. Com taxas de arrefecimento lentas e controladas reduzem as variações de volume das células, minimizando a formação de cristais de gelo. Com a adição de crioprotectores não permeáveis e de baixo peso molecular, em associação com crioprotectores permeáveis, é aumentada a concentração destes no interior das células, atingindo-se o objectivo de desidratação das mesmas com redução da formação de cristais de gelo (Palasz & Mapletoft, 1996).

Sendo os crioprotectores permeáveis indispensáveis ao processo de congelação, a sua toxicidade constitui um factor que necessita ser tido em consideração, para que não haja uma redução da viabilidade dos embriões. Ela varia conforme o crioprotector, sendo menos tóxica no caso do EG e glicerol. Para a congelação lenta, a sua concentração limite é 1-2M e a toxicidade é relativamente baixa (Palasz & Mapletoft, 1996).

1.7.2. Técnicas de congelação

1.7.2.1. Congelação lenta convencional

A congelação lenta controlada, também referida na literatura como convencional ou congelação controlada, normalmente envolve a utilização de um congelador programável, de forma a baixar a temperatura a uma velocidade de 0,5° C a 1° C por minuto (Mapletoft, 2006; Hasler, 2010b) desde a temperatura de “seeding” (entre os - 5° C e os - 7° C), que é executado com uma pinça previamente arrefecida/mergulhada em azoto líquido (Hasler, 2010b). O “seeding” possibilita o início da formação extracelular de cristais de gelo de forma controlada e continuada, evitando a congelação rápida da água, o que permite o seu abandono das células à medida que concentração extracelular aumenta, desidratando-as, sem que ocorram os efeitos deletérios causados por congelação rápida (Youngs, 2011).

Os embriões permanecem entre -6 a -7 °C aproximadamente 10 minutos, de forma a estabilizar a temperatura e o volume celular. A temperatura vai descendo até à temperatura de -30° C a -35° C, permitindo a gradual formação cristais de gelo extracelular e, a partir desse momento, o embrião é colocado no interior do azoto líquido (Hasler, 2010b). O aumento da concentração extracelular da solução origina a desidratação intracelular, substituindo a água por crioprotectores permeáveis (Palasz & Mapletoft, 1996).

Inicialmente, os procedimentos de congelação convencional usavam crioprotectores como o glicerol ou o DMSO, juntamente com soro fetal a 10%, como ingredientes do meio

“standard” de congelação de embriões, mais tarde substituído por BSA (Hasler, 2010b). Contudo, em 1992, Voelkel e Hu, introduziram o EG como crioprotector. O seu baixo peso molecular permite um bom equilíbrio osmótico sem que as células aumentem de volume abruptamente e possam rupturar. Assim, o uso de EG permitiu que os embriões fossem congelados e transferidos directamente para o útero das receptoras sem sofrerem alterações osmóticas, processo conhecido como transferência directa (TD) (Hasler, 2010b).

1.7.2.2. Transferência directa (TD)

Devido à sua conveniência e consenso em todo o mundo, a TD tornou-se um procedimento “standard” na indústria da TE (Hasler, 2010b). Enquanto se usou o glicerol como crioprotector havia a desvantagem de ter de se possuir material para a descongelação, lupa e um embriologista treinado (Hasler, 2003; Hasler, 2006).

Com a TD o embrião pode ser descongelado na mesma palhinha em que foi congelado e ser transferido de imediato para a receptora, sem haver decréscimos significativos da TG (Voelkel & Hu, 1991; Leibo & Mapletoft, 1998; Hasler, 2004).

Uma vantagem contributiva para o sucesso da TD é a redução do número de lesões causadas no embrião por um potencial choque osmótico. As lesões osmóticas acontecerão se o crioprotector intracelular não conseguir difundir rapidamente para o exterior e prevenir o influxo repentino de água em sentido inverso, por gradiente osmótico (Palasz & Mapletoft, 1996). Após a descongelação da palhinha tal facto provocaria o aumento do volume celular e lise das células (Hasler, 2010b). A utilização de crioprotectores altamente permeáveis, que permitem uma rápida difusão através da membrana celular, é fundamental para o sucesso do processo (Palasz & Mapletoft, 1996).

Outro dos grandes avanços atingidos pela tecnologia de TE, que teve um impacto significativo no mercado de exportação, foi a utilização do EG para TD após descongelação (Hasler, 2003; Hasler, 2006), apesar das TG serem semelhantes para estes dois crioprotectores (glicerol e EG) (Hasler, 2010b). O EG possui baixa toxicidade e é mais permeável para embriões e oócitos que o glicerol, DMSO, propilenoglicol e acetamida (Campos-Chillón, Suh, Barcelo-Fimbres, Seidel Jr & Carnevale, 2009).

Com esta abordagem a palhinha contendo o embrião é manipulada com grandes parecenças com a descongelação do sémen para IA (Mapletoft, 2006). Contudo, este avanço no procedimento de congelação, com a evidente simplificação do processo de descongelação e transferência, não conduziu a um aumento da importação de embriões por parte dos países em desenvolvimento (Hasler, 2003).

1.7.2.3. Vitrificação

Os processos de congelação e descongelação são consumidores de tempo e requerem o uso de material adequado e dispendioso. Os complexos procedimentos de congelamento de embriões, podem ser substituídos por um simples método de vitrificação (Mapletoft & Hasler, 2005). Neste processo é usada uma associação de crioprotectores em concentrações elevadas, onde é colocado o embrião que depois é introduzido na palhinha que, por sua vez, é mergulhada directamente no azoto líquido. Como resultado das elevadas concentrações daqueles e do processo ultra-rápido de congelação não se formam cristais, mas pelo contrário, a solução congelada assume uma forma vítrea (Mapletoft & Hasler, 2005; Mapletoft, 2006; Youngs, 2011).

A formação de cristais de gelo é uma das consequências da congelação e, por consequência, a vitrificação pode vir a ter muito para oferecer no que se refere à criopreservação de oócitos e embriões produzidos *in vitro*, tendo como maior vantagem a sua simplicidade e economicidade (Mapletoft & Hasler, 2005). A vitrificação é largamente usada experimentalmente e os resultados obtidos indicam que os embriões bovinos poderão ser vitrificados em palhinhas de 0,25 mL para transferência directa (Wagtendonk-de Leeuw, Van den Daas & Rall, 1997, citados por Hasler, 2010b), podendo obter-se TG semelhantes às outras técnicas. Hasler (2010b) refere que a maior parte das abordagens da vitrificação envolve processos extremamente rápidos de congelação, com o auxílio de material e contentores especializados. Contudo, do ponto de vista prático, nenhum destes sistemas permite a TD dos embriões para receptoras a partir do dispositivo onde foram vitrificados. Sistemas de vitrificação que não permitam a TD não são susceptíveis de poderem vir a ser aceites em programas comerciais de TE (Hasler, 2010b).

II. GENERALIDADES SOBRE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO (RMG) E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE E TARDIA (MEP/T)

2.1. RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO (RMG)

2.1.1. Período de pré-reconhecimento materno

Os meios de suporte materno para o crescimento e desenvolvimento do blastocisto até ao final da organogénese (embrião, feto e membranas associadas) são críticos para a sinalização do reconhecimento materno e para a implantação em ruminantes (Spencer, Johnson, Bazer & Burghardt, 2007). O estabelecimento de um ambiente adequado no oviducto e a produção de secreções tubáricas são responsáveis pela nutrição do embrião nos primeiros estádios de desenvolvimento (Robinson, Hammond, Wathes, Hunter & Mann, 2008). Nos bovinos, após a eclosão da zona pelúcida entre o dia 9 e 10, o blastocisto assume uma forma tubular e ovóide no 13º dia (Spencer, Johnson, Bazer & Burghardt, 2004a). O conceito ovóide começa a alongar-se e dá origem a uma estrutura filamentosa de 14 cm de comprimento ao 19º dia. O alongamento do conceito envolve o aumento do tamanho e peso da trofoectoderme, com a diferenciação das membranas extra-embrionárias, (Wales & Cuneo, 1989) e requer a secreção de substâncias pelas células epiteliais superficiais do endométrio e epitélio glandular (Gray, Burghardt, Johnson, Bazer & Spencer, 2002; Groebner et al., 2011). Durante a fase inicial de gestação as funções endometriais são reguladas pela P_4 do CL e pela secreção de citocinas e hormonas da trofoectoderme, incluindo o IFN- τ (Roberts, Ezashi, Rosenfeld, Ealy & Kubisch, 2003; Spencer, Johnson, Burghardt & Bazer, 2004b; Forde et al., 2011).

2.1.2. A comunicação mãe-embrião

Nos bovinos o diálogo mãe-embrião é ainda pouco conhecido (Wolf et al., 2003). O chamado reconhecimento materno da gestação (RMG) é o processo pelo qual o conceito sinaliza a sua presença à entidade materna. Isto resulta na inibição da secreção de $PGF_{2\alpha}$, prevenção da regressão do CL e manutenção da secreção de P_4 , que é essencial para a gestação (Binelli, Thatcher, Mattos & Baruselli, 2001; Gordon, 2002; Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012).

No momento de entrada no útero o embrião sofre alterações morfo-funcionais e, entre os 14 e os 17 dias (Tesfaye, Salilew-Wondim & Schellander, 2011), por ocasião do chamado período crítico (Binelli et al., 2001), o mesmo aumenta de tamanho e produz IFN- τ a partir das suas células trofoblásticas (Kerblert et al., 1997; Stevenson et al., 2008; Tesfaye et al., 2011).

A produção de IFN- τ atinge o pico antes do embrião se implantar no útero. Após este momento a sua secreção é atenuada. O IFN- τ interage com os seus receptores específicos

nas células epiteliais superficiais e nas células glandulares epiteliais superficiais do endométrio (Tesfaye et al., 2011) e modula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo mesmo, mantendo assim a função do CL (Mann, Lamming, Robinson & Wathes, 1999).

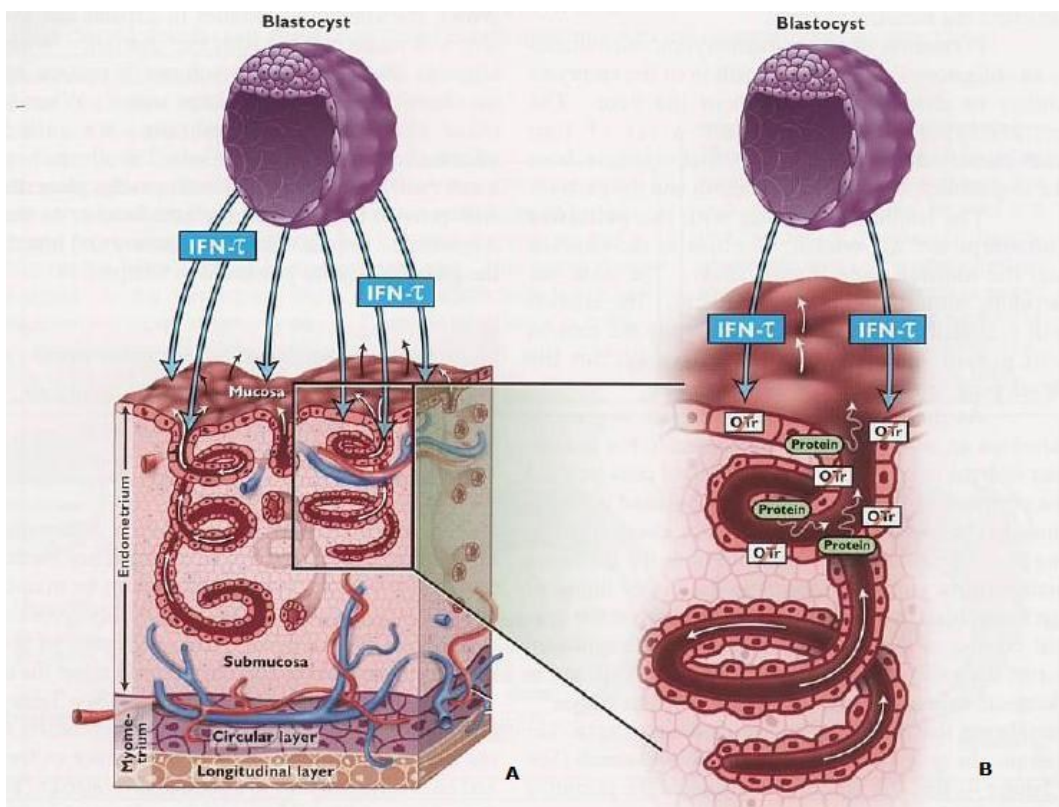
No período de pré-implantação, tanto o embrião como o endométrio produzem citocinas e factores de crescimento que permitem a regulação do desenvolvimento do blastocisto e a estimulação da produção do $\text{IFN-}\tau$ (Roberts, Ezashi, Rosenfeld, Ealy & Kubisch, 2003; Forde et al., 2011). Assim, conceitos de menores dimensões poderão revelar atrasos de desenvolvimento em virtude de uma insuficiente produção de $\text{IFN-}\tau$ para o bloqueio da luteólise (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012).

A chave para o desencadeamento da luteólise está na regulação dos receptores de oxitocina (OT) no epitélio endometrial (Mann & Lamming, 1999; Gordon, 2002). A OT é produzida no CL e pelo hipotálamo, são responsáveis pela estimulação das células do endométrio para a síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Gordon, 2002; Senger, 2003). Contudo, a presença de E_2 também é importante para que a luteólise ocorra (Binelli et al., 2001) e a sua produção pelos folículos ovários interfere na expressão dos receptores da OT (Balaguer, Pershing, Rodriguez-Sallaberry, Thatcher & Badinga, 2005). Assim, elevadas concentrações de E_2 estão associadas à perda embrionária durante o RMG (Inskeep, 2004).

As concentrações circulantes de P_4 parecem ter uma forte relação com o RMG (Binelli et al., 2001). Apesar de ser assunto com alguma controvérsia, vacas com maiores concentrações plasmáticas de P_4 , durante o período crítico, (previamente definido) parecem produzir conceitos maiores, que por sua vez segregam uma maior quantidade de $\text{IFN-}\tau$ (Mann et al., 1999; Green, Hunter & Mann, 2005; Rossetti et al., 2011). Inicialmente, as concentrações desta hormona suprimem a expressão dos receptores de OT, mas após um período de exposição de 10 dias esta acção cessa (Robinson et al., 2008).

O sucesso do estabelecimento de uma gestação por TE depende da premissa de que o embrião é colocado no corno uterino ipsilateral ao do CL funcional. Na maioria das vezes, as TE ocorrem entre o 6º e o 7º dia, após a demonstração de cio da receptora, e a colocação mais cranial possível do embrião aparentemente maximiza a TG (McNaughtan, 2004). O comprometimento ocasional desta em determinadas receptoras pode resultar da manipulação excessiva do útero por parte do operador, o que aumentaria os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lúmen uterino (Odensvik, Duchens e Gustafsson, 1993, citados por McNaughtan, 2004; Schrick, Scenna, Edwards, Hockett & Saxton, 2003).

Figura 4. Ilustração da sinalização antiluteolítica. Retirado e adaptado de Senger (2003).



Legenda. (A) – Produção de IFN-τ pelo Blastocisto e ligação deste ao endométrio; (B) – Inibição dos receptores de OT e a produção de proteínas nas glândulas uterinas.

Mesmo uma manipulação cuidada pode fazer elevar a $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lúmen uterino (Wann & Randel, 1990). Esse aumento interfere no desenvolvimento embrionário e afecta directamente a qualidade daquele (Scenna et al., 2005) enfraquecendo também a função lútea (Beal, Hinshaw & Whitman, 1998) e, como é sabido, um défice de P_4 nesse periodo conduz a um atraso no desenvolvimento e à ME (Robinson et al., 2008). Portanto, existe assim uma correlação inversa entre a TG e o tempo dispendido com a TE (Rowe, Del Campo, Crister & Guinther, 1980, citados por Purcell, Beal & Gray, 2005).

Em conclusão, o desenvolvimento embrionário precoce, a implantação e a manutenção da gestação dependem inteiramente de uma adequada comunicação mãe-embrião (Wolf et al., 2003).

2.1.3. Interferão-tau bovino (bIFN-τ)

O blastocisto bovino produz uma proteína específica que determina o sinal de prevenção da luteólise. Esta proteína, anteriormente denominada proteína trofoblástica bovina 1 (bTP-1), faz parte do grupo dos interferões (IFN). Os interferões têm funções diferenciadas e conhecidas, mas porque a bTP-1 possui uma actividade específica foi nomeada interferão-τ

bovino (bIFN- τ). Tendo sido escolhida a sigla “ τ ”, do alfabeto grego, pela sua origem trofoblástica (Senger, 2003). É produzido em quantidades suficientes para manter o CL, entre o 15º e o 17º dia de gestação (Thatcher, Macmillan, Hansen & Drost, 1989). Porém, segundo os mesmos autores, a produção de P_4 pelo CL não pode ser aumentada pela acção do IFN- τ , assumindo-se a ausência de uma acção luteotrófica. Mais tarde, Kerbler et al. (1994) e Senger (2003) confirmaram a existência de uma correlação positiva entre a concentração de P_4 e a síntese de IFN- τ pelo concepto, sugerindo que o aumento dos níveis de P_4 é benéfico para o desenvolvimento embrionário.

A ligação do IFN- τ ao endométrio inibe a síntese de receptores de OT pelas células endometriais (Derecka, Man, Flint & Watches, 2000) (Figura 4). Quantidades inadequadas daquele IFN conduzem ao aumento indirecto da produção de $PGF_{2\alpha}$ no útero e a consequente interrupção da gestação (Leunget al., 2000). Deste modo, o endométrio numa situação de não-gestação inicia uma cascata de reacções bioquímicas, tendo como resultado final a luteólise (Thatcher, Guzeloglu, Mattos, Binelli, Hansen & Pru, 2001).

Larson et al. (2001) admitem ainda que existe uma maior produção de IFN- τ pelos embriões femininos que pelos masculinos. Este facto foi, mais tarde, confirmado por outros, no entanto a sua explicação ainda permanece um enigma (Walker, Kimura & Roberts, 2009).

2.1.4. Prostaglandinas $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2

As prostaglandinas (PG) são potentes mediadores para uma vasta quantidade de processos fisiológicos e patológicos. Estas moléculas são reconhecidas como mediadores locais, actuando primariamente sobre o tecido onde são produzidas. As PG são particularmente importantes na regulação da função reprodutiva feminina, controlando desde a ovulação até ao reconhecimento e manutenção da gestação e parto (Parent, Madore, MacLaren & Fortier, 2006).

As PG produzidas pelo endométrio têm um papel primordial na regulação dos processos reprodutivos e no sucesso do estabelecimento da gestação (Poyser, 1995). Neste cenário, existem prostaglandinas, como a $PGF_{2\alpha}$ e a PGE_2 , conhecidas por induzirem efeitos opostos nos tecidos (nos rins, sistema vascular, miométrio e no CL de várias espécies). Nos ruminantes, a $PGF_{2\alpha}$ de origem uterina é responsável pela luteólise e valores altos podem condicionar a gestação (Parent, Chapdelaine, Sirois & Fortier, 2002). Pelo contrário, a PGE_2 actua como agente luteotrófico ou antiluteolítico (Pratt, Butcher & Inskeep, 1995). Também produz uma imunomodulação que auxilia na prevenção da rejeição do embrião (Lala, 1990), funcionando como sinal para o RMG (Cheng, Sheldrick, Marshall, Wathes, Abayasekara & Flint, 2007).

O rácio $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ pode ser modulado a favor da PGE_2 e do estabelecimento da gestação por três processos diferentes: a bem aceite hipótese de decréscimo da produção da $\text{PGF}_{2\alpha}$; a conversão de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em PGE_2 , o aumento da PGE_2 por estimulação da PGE sintetase (Parent et al., 2002).

A sinalização intracelular através da adenilciclase e do 3', 5' AMP cíclico desempenha um papel importante na preparação para a implantação do embrião. Componentes activadores da adenilciclase no endométrio incluem a PGE_2 e a LH, entre outras, directamente implicadas nas alterações do endométrio nos primeiros momentos da gestação (Cheng et al., 2007).

2.1.5. Níveis plasmáticos de P_4

A P_4 é uma hormona esteróide que desempenha um papel fundamental nos eventos associados ao RMG (Diskin & Morris, 2008). Ela é responsável pela criação de um ambiente propício ao desenvolvimento embrionário e as suas elevadas concentrações são potenciadoras de maiores produções de $\text{IFN-}\tau$, e também da TG, em bovinos (Mann et al., 1999; Carter et al., 2008). Os seus níveis plasmáticos são determinantes durante a luteólise, podendo afectar o desenvolvimento dos sinais luteolíticos. Assim, vacas com baixas concentrações de P_4 estão mais sujeitas à perda embrionária (Mann & Lamming, 1995; Mann et al., 1999) e a consequentes baixas TG (Wathes, Taylor, Cheng & Mann, 2003). Vacas tratadas com esta hormona produziram embriões com taxas de crescimento e de produção de $\text{IFN-}\tau$ mais elevadas (Geisert, Zavy, Biggers, Garrett & Wettemann, 1988). O mesmo observaram Carter et al. (2008) com animais tratados no período imediatamente pós-IA.

Uma falha de estimulação do CL por parte do embrião ou um CL incompetente poderão comprometer a sobrevivência embrionária (Chagas e Silva et al., 2002). A medição de P_4 plasmática no 7º dia do ciclo éstrico revelou concentrações inferiores para vacas receptoras, comparativamente a novilhas, corroborando a importância da hormona naquele tipo de fêmeas (Chagas e Silva et al., 2002).

Assim alguns autores concluíram haver melhoria da TG com o aumento das concentrações de P_4 (Mann et al., 1999; Wathes et al., 2003; Carter et al., 2008). Porém, Chagas e Silva, Cidadão & Costa (1993), verificaram não haver qualquer relação entre o teor de P_4 plasmática no dia da TE e a subsequente TG.

2.1.6. Ciclo-oxigenase (COX)

As PG estão envolvidas em vários processos do desenvolvimento embrionário precoce, nomeadamente na expansão e eclosão dos blastocistos (Lewis, 1989). A ciclo-oxigenase (COX) é a enzima responsável pela metabolização do ácido araquidónico (AA) em prostaglandina H₂ (PGH₂), precursora de todas as PG. A COX foi identificada nos embriões bovinos logo a partir do estágio de duas células apresentando, no entanto, uma expressão transitória associada às primeiras clivagens, decrescendo no estágio de mórula (Gurevich & Shemesh, 1994).

A COX apresenta duas isoformas, a COX-1 e a COX-2, com constituições e funções diferentes. Codificadas por genes diferentes, catalisam a dupla oxigenação e a redução do AA (Parent, Chapdelaine, Sirois & Fortier, 2002). Foi ainda demonstrado que o aumento da produção de PGE₂ observado no endométrio *in vitro* está correlacionado com a indução específica da COX-2, mas não da COX-1 (Asselin, Lacroix & Fortier, 1997).

2.1.7. Concentração de estrogénio (E₂)

Os efeitos deletérios da excessiva secreção de estrogénios pelos folículos de maiores dimensões também podem ser observados durante o RMG. Concentrações periféricas de E₂ no plasma foram medidas durante o 14º e o 17º dia após beneficiação, em 100 bovinos. As TG após IA decresceram com o aumento das concentrações de E₂, tendo sido sugerido que a secreção de estrogénios durante aquele período de tempo, poderia comprometer directamente a sobrevivência embrionária ou interferir no RMG e manutenção da fase lútea (Pritchard, Schrick & Inskeep, 1994). O E₂ produzido por esses folículos interagiria com os receptores de E₂ no endométrio, o que resultaria no aumento da expressão génica dos receptores de OT nas células endometriais, determinante para a libertação pulsátil de PGF_{2α} (Balaguer et al., 2005). A E₂, endogenamente ou por administração exógena, é capaz de induzir a produção de PGF_{2α}, promovendo a diminuição da concentração de P₄ por regressão do CL (Auletta & Flint, 1988). Recentemente, Castro e Paula (2003) verificaram que a concentração sérica do principal metabolito da PGF_{2α} aumentou 15 minutos após a injeção de OT e 3 horas e 30 minutos após a de E₂. Embora se especule que existem mecanismos pelos quais o E₂ estimula a síntese de proteínas directamente envolvidas na cascata que gera a PGF_{2α}, estes não foram ainda determinados (Castro e Paula, 2003).

2.1.8. Factor de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1)

O factor de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) é um péptido relativamente pequeno, composto por 70 aminoácidos, que desempenha um papel importante nos processos fisiológicos básicos como o crescimento, desenvolvimento, função imunitária, reprodução e metabolismo (Rhoads et al., 2010). Em bovinos, o receptor do IGF-1 é expresso em todos os estádios de desenvolvimento embrionário pré-implantação (Lonergan et al., 2003), sugerindo que o embrião é capaz de responder às concentrações de IGF-1 ao longo do tracto reprodutivo (Rhoads et al., 2010). Ficou demonstrado que as baixas concentrações deste factor podem limitar o desenvolvimento embrionário, terminando com a perda embrionária precoce (Rhoads et al., 2010).

O efeito positivo do IGF-1 na embriogénese foi proposto depois da observação da melhoria na produção de embriões bovinos *in vitro* após a suplementação com IGF-1 (Moreira et al., 2002b). Os efeitos benéficos do IGF-1 também foram visíveis no decréscimo da apoptose e no aumento do número total de células em embriões livres (Byrne, Southgate, Brison & Leese, 2002).

2.1.9. Factor de necrose tumoral α (TNF- α)

O factor de necrose tumoral (TNF), produzido e segregado pelas células do sistema imunitário (macrófagos e mastócitos), de acordo com Pate e Keyes (2001), participa no funcionamento e na organização da luteólise em bovinos. Um estudo realizado *in vivo* revelou que o TNF- α altera o tempo de vida útil do CL. Após uma infusão de 10 μ g de TNF- α as concentrações de P_4 e PGE_2 aumentaram no sangue e prolongaram o tempo de vida útil do CL. Por outro lado, baixas concentrações (1 μ g) do mesmo promoveram a estimulação da produção uterina de $PGF_{2\alpha}$ e de vários factores luteolíticos, resultando numa luteólise prematura (Skarzynski et al., 2003). Esta acção é maioritariamente causada pelos efeitos indirectos do TNF- α no CL bovino, por via da estimulação da secreção uterina de prostaglandinas (Miyamoto, Skarzynski & Okuda, 2000, citados por Bilodeau-Goesseels e Kastelic, 2012; Skarzynski et al., 2007). Existe assim uma forte evidência de que a acção do TNF- α no funcionamento do CL está fortemente associada à luteólise (Korzekwa, Murakami, Wocławek-Potocka, Bah, Okuda & Skarzynski, 2008) e que, por outro lado, também possui acção luteotrófica. Além disso, foi detectado TNF- α e os seus receptores no CL nas fases iniciais da gestação em bovinos (Sakumoto, Murakami, Kishi, Iga, Okano & Okuda, 2000).

2.1.10. Hormona do crescimento (GH)

A hormona do crescimento (GH) que é sintetizada e libertada pelas células somatotróficas, localizadas na hipófise anterior, está envolvida num variado número de processos biológicos, entre eles a lactação e a reprodução, estando também envolvida na estimulação da síntese de IGF-1, pelo fígado (Rhoads et al., 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que a GH é responsável por efeitos distintos no desenvolvimento, diferenciação e metabolismo de embriões pré-implantação.

O desenvolvimento de embriões bovinos em culturas *in vitro* melhorou consideravelmente suplementando o meio com GH (Moreira, Paula-Lopes, Hansen, Badinga & Thatcher, 2002). Culturas de células epiteliais do oviducto respondem ao tratamento com GH aumentando a síntese de IGF-1. Por seu turno, a produção de PGF_{2α} pelo oviducto é inibida após o tratamento com a mesma hormona. Contudo, estes possíveis efeitos no desenvolvimento e sobrevivência embrionária ainda não estão completamente compreendidos (Rhoads et al., 2010).

2.2. MORTALIDADE EMBRIONÁRIA PRECOCE E TARDIA (MEP/T)

A sobrevivência embrionária é o factor que mais afecta a produção e a eficiência económica em todos os sistemas de produção de carne e leite em ruminantes (Vanroose, de Kruif & Van Soom, 2000; Gordon, 2002; Diskin & Morris, 2008).

Na vaca o período embrionário começa com a fertilização, estendendo-se até ao final da fase de diferenciação (dia 42), e o período fetal prolonga-se desde o 42º dia até ao parto (Nomenclature, 1972).

Sreenan e Diskin (1994) consideram que quase 80% da mortalidade embrionária (ME) ocorre entre o 8º e o 18º dia após a beneficiação. Entre o 18º e o 50º dia de gestação a percentagem de perdas baixa para 10 a 15%. Quando a ME ocorre antes do 16º-17º dias é normal que a vaca retorne ao cio, após um ciclo éstrico de duração normal. Pelo contrário, se a vaca sofrer ME após esse período poderá repetir o cio, mas com intervalos mais longos e irregulares. Os mesmos autores consideraram que entre o 50º dia de gestação e o fim da mesma a incidência de morte fetal (MF) rondava os 5 a 8%.

Vários autores são de opinião que a maioria da ME, cerca de 40%, ocorre durante o período mais precoce da gestação, por volta do 16º dia, isto é, perto do momento de RMG (Thatcher et al., 2001a; Diskin & Morris, 2008; Lonergan, 2011; Diskin et al., 2012), contribuindo para a maior fonte de prejuízo para a reprodução (Thatcher et al., 2001a; Gordon, 2002). Esta alta proporção de perdas é coincidente com o período de inibição de secreção uterina de PGF_{2α} pelo conceito, sugerindo que algumas delas podem dar-se porque alguns conceitos são

incapazes de sustentar aquela inibição (Thatcher et al., 2001b). Reduções nas perdas embrionárias, tanto por aumento dos sinais de RMG como por selecção da receptora mais adequada, levam a uma redução dos custos na produção bovina (Binelli et al., 2001). O desenvolvimento do embrião envolve não só o “diálogo” com o oviducto e ambiente uterino, como também depende da qualidade oocitária (Thatcher, Staples, Danet-Desnoyers, Oldick & Schmitt, 1994).

Foi sugerido que a ME pode ser maior após a TE do que após IA. Facto não surpreendente dado as agressões a que são sujeitos os embriões em termos de exposição a factores ambientais algo estranhos ao oviducto e ao útero bovino (Betteridge & Loskutoff, 1993, citados por Gordon, 2002). Este autor considera que a maior parte das perdas embrionárias ocorre 3 semanas após a IA, ao passo que na TE existem preocupações para perdas continuas até ao período de estabelecimento da placenta.

De forma a simplificar os períodos de ME, Walsh et al. (2011) definiram a ME muito precoce (0 ao 7º dia de gestação), o período de ME precoce (7º ao 24º dia), a ME tardia (24º ao 45º dia) e, por fim, a mortalidade fetal após o 45º dia (MF).

2.2.1. Mortalidade embrionária precoce (MEP)

Grande parte das causas de ME muito precoce está centrada na incapacidade de desenvolvimento dos embriões em estádios precoces, como consequência de oócitos de fraca qualidade ou ambiente uterino inadequado (Thatcher et al., 1994; Walsh, Williams & Evans, 2011), falhas na fertilização e defeitos genéticos (Sartori, 2004). A taxa de mortalidade nesta altura é normalmente inferior a 10%, mas pode aumentar para valores próximos dos 40%, caso haja influência do stress hipertérmico (Sartori, 2004).

O microambiente uterino desempenha um papel importante na determinação da qualidade embrionária (Thatcher et al., 1994; Vanroose et al., 2000; Rizos, Ward, Duffy, Boland & Lonergan, 2002). Baixas concentrações de P₄ e de IGF's podem criar um ambiente sub-ótimo que impossibilitará o suporte ao embrião durante o seu desenvolvimento precoce (Leroy, Opsomer, Van Soom, Goovaerts & Bols, 2008). A função uterina também pode ficar comprometida pela presença de agentes patogénicos que causam ME, ou aborto (Sheldon, Lewis, LeBlanc & Gilbert, 2006).

Relativamente ao alongamento do intervalo entre estros e entre ovulações, em animais postos à cobrição, usualmente o mesmo indica que a perda embrionária ocorreu durante o período de manutenção do CL (Humblot, 2001). O retorno ao estro antes do 24º dia poderá estar ligado à MEP, porém se houver manutenção do CL e se aquele retorno ocorrer depois do dia 24 poderá indicar perda embrionária após o 16º dia de gestação.

Num estudo realizado por Chagas e Silva, Diniz e Lopes da Costa (2008), ficou demonstrado que a MEP foi significativamente maior em hemi-embriões, quando comparados com embriões inteiros, tendo sido atribuída a responsabilidade à menor produção de IFN- τ pelas poucas células trofoectodérmicas daqueles.

2.2.2. Mortalidade embrionária tardia (MET) e mortalidade fetal (MF)

Nos bovinos a MET ocorre em menor percentagem que a MEP, contudo causa sérias perdas económicas, pois torna-se temporalmente difícil uma nova beneficiação, ainda económica, das fêmeas (Dunne, Diskin & Sreenan, 2000; Diskin & Morris, 2008). Embora a extensão de perdas com a MET e com a mortalidade fetal precoce seja relativamente baixa (Beltman, Lonergan, Diskin, Roche & Crowe, 2009; Walsh et al., 2011), comparadas com aquelas que ocorrem 24 dias após a IA, mesmo assim representam prejuízos económicos avultados e grandes dificuldades de maneio. Assim, é importante minorar a exposição a factores ambientais stressantes e agentes patogénicos, de forma a evitar perdas gestacionais (Walsh et al., 2011).

Em dois estudos citados por Diskin e Morris (2008) um grupo significativo de vacas leiteiras em regime de pastoreio foi sujeito a ecografia diária desde o 28º a 30º dia e o 42º e o 67º dia de gestação, tendo sido reportado um máximo de MET/MF entre 7,2% e 7,5%, concluindo-se ser relativamente baixa a taxa de MET (Silke et al., 2001; Horan, Mee, Rath, O'Connor & Dillon, 2004).

No estudo de Chagas e Silva et al. (2008) os seus autores também concluíram que hemi-embriões revelaram maior MET quando comparados com embriões inteiros.

2.2.3. Causas de Mortalidade Embrionária (ME) e Mortalidade Fetal (MF)

A maior parte da ME, cerca de 70%, resulta de causas não-infecciosas (Christianson, 1992), isto é, causas intrínsecas ao embrião ou defeitos deste, ambiente uterino materno inadequado, assincronia entre a mãe e o embrião, falha no reconhecimento materno e inadaptação aos sinais antiluteolíticos enviados pelo embrião (Christianson, 1992; Vanroose et al., 2000; Hansen, 2002). As causas não infecciosas são multifactoriais e difíceis de diagnosticar (Vanroose et al., 2000).

Para um desenvolvimento embrionário completo contribuem diversos factores. O embrião tem de ser capaz de executar o seu programa de desenvolvimento no microambiente disponibilizado pela mãe (Hansen, 2002) e o seu destino depende de importantes acontecimentos que antecedem a fertilização, como incompetência oocitária que inviabiliza o desenvolvimento (Thatcher et al., 1994; Hansen, 2002). Oócitos provenientes de folículos

persistentes, alterações cromossômicas causadas por gâmetas incompetentes e genes homozigóticos recessivos são exemplos de erros intrínsecos de perda embrionária (Hansen, 2002).

2.2.3.1. Genéticas

A raça Holstein possui dois grandes defeitos genéticos recessivos, que afectam a sobrevivência do embrião ou do feto: a deficiência de uridina-5'-monofosfato sintetase e a má formação vertebral complexa. A primeira afecção é controlada por um gene homozigótico recessivo que causa mortalidade fetal antes do 40º dia de gestação (Thatcher et al., 1994; Zavy, 1994), o rastreio desta em touros de centros de IA, reduziu a frequência de touros heterozigóticos e de embriões homozigóticos recessivos e, actualmente, foi eliminada esta causa de infertilidade (VanRaden & Miller, 2006). Considerando a existência de vários problemas de origem genética que comprometem a fertilidade, a consanguinidade é um outro problema que afecta as espécies pecuárias. A solução, ainda que discutível, poderá passar pelo recurso a esquemas de “cross-breeding” (cruzamento entre raças) (Hansen, 2000). A malformação vertebral complexa é mais uma condição recessiva letal que causa mortalidade fetal tardia em bovinos. Este defeito foi disseminado em grande escala por via da IA (Diskin & Morris, 2008).

Estudos têm mostrado que a taxa de perdas embrionárias relacionadas com defeitos genéticos é de aproximadamente 8% (Gordon, 2002).

2.2.3.2. Fisiológicas

2.2.3.2.1. Produção leiteira

Nas fêmeas em produção o aumento da produção leiteira é acompanhado de um aumento da ingestão de alimento e de outros índices metabólicos, o que pode influenciar as concentrações dos esteróides ovários (Sangsritavong, Combs, Sartori, Amentano & Wiltbank, 2002).

Se as vacas leiteiras altas produtoras têm um aumento pouco significativo de P_4 durante o início do diestro, este facto poderá comprometer o desenvolvimento embrionário (Mann & Lamming, 1999), o RMG (Walsh, Williams & Evans, 2011) e, consequentemente, a TG (Wathes, Taylor, Cheng & Mann, 2003).

Contudo, ao contrário das vacas leiteiras, novilhas do mesmo tipo de aptidão e com mérito genético similar têm TG superiores e a mesma não tem decrescido após melhoramento genético intensivo (Pryce, Royal, Garnsworthy & Mao, 2004).

Apesar das observações acima revistas, não foi encontrada uma relação directa entre a produção leiteira e o risco do aumento das TG ou da mortalidade embrionária e fetal (Chebel, Santos, Reynolds, Cerri, Juchem & Overton, 2004; Chebel et al., 2008).

2.2.3.2.2. Idade

Foi referido por Humblot (2001) e por Diskin, Murphy & Sreenan (2006), após terem comparado a MEP entre vacas altas produtoras e novilhas do mesmo tipo de aptidão, que ela é mais elevada nas primeiras. Animais mais velhos têm actividade folicular menos eficiente e baixa qualidade oocitária, resultando numa diminuição de competência embrionária. Além disso, a qualidade do endométrio deteriora-se com o avançar da idade (Vanroose et al., 2000).

2.2.3.3. Endócrinas

As causas endócrinas podem desempenhar um importante papel na ME. Para se entender a sua influência, deve estar-se familiarizado com a composição estrutural e funcional do CL e a interacção entre diferentes hormonas reprodutivas que afectam a vida útil da fase lútea (Bajaj, 2001). As concentrações sistémicas de P_4 durante o ciclo éstrico, antes e depois da IA afectam a sobrevivência embrionária, com evidência de que as elevadas (na altura do cio) ou mesmo muito baixas (subfunção lútea) estão negativamente associadas à viabilidade do embrião (Diskin & Morris, 2008; Diskin, Parr & Morris, 2012). Os potenciais mecanismos pelos quais as baixas concentrações de P_4 durante o ciclo precedente reduzem a fertilidade e a sobrevivência embrionária incluem a produção de oócitos num estado avançado de maturação no momento da ovulação provenientes de folículos persistentes, o aumento dos pulsos de LH, que por sua vez induzem um aumento da secreção de E_2 ou ainda a alteração da morfologia do endométrio (Diskin, Murphy & Sreenan, 2006). É possível atribuir à inadequada função lútea alguma responsabilidade na MEP, por via de uma baixa secreção de P_4 . Folículos muito pequenos dão origem a CL de tamanho pequeno e produção de P_4 sub-normal, e consequentes TG mais baixas, quando se compara com folículos maiores (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012).

Fases lúteas de curta duração podem ser observadas em novilhas e em vacas no reinício da actividade ovulatória. Se o CL regredir antes do 14º dia não será possível suportar a gestação. Ficou claro que quando o primeiro CL pós-parto começa a segregar P_4 a secreção de $PGF_{2\alpha}$ também se eleva mais precocemente, levando à luteólise (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012).

2.2.3.4. Infecciosas

O embrião é susceptível a infecções em duas fases importantes, antes e após a eclosão (Vanroose et al., 2000).

De todos os agentes patogénicos os vírus são os mais insidiosos e perigosos agressores, nos primeiros estádios do desenvolvimento embrionário. A infecção vírica da zona pelúcida de embriões intactos pode acontecer antes da fertilização, durante a maturação oocitária (Vanroose et al., 2000). Após a fertilização, a zona pelúcida é considerada uma barreira eficiente contra a penetração (Stringfellow et al., 2004). Porém, alguns estudos consideram que o embrião também pode estar susceptível a esse tipo de agente após a eclosão ou mesmo após a implantação (Vanroose et al., 2000; Kelling, 2007; Givens & Marley, 2008). Contudo, nos primeiros estádios de desenvolvimento, a ME pode ocorrer num embrião com a zona pelúcida intacta, em virtude de um ambiente uterino hostil (Vanroose et al., 2000).

Tabela 4. Causas bacterianas de mortalidade embrionária e fetal.

| Causas bacterianas | | | | |
|-------------------------------|---|---|---|--|
| Agente | Características do agente | Transmissão | ME / MF | Referência bibliográfica |
| <i>Brucella abortus</i> | Cocobacilo Gram negativo; não encapsulado; não esporulado | Feto abortado, placenta, muco uterino contaminado; sémen (menor expressão) | Alta % de aborto. Normalmente depois do 5º mês de gestação | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |
| <i>Campylobacter fetus</i> | Gram negativo; microaerofílica | Cobrição natural, IA, material contaminado | <10% abortam entre o 4º e o 7º mês de gestação | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |
| <i>Histophilus somni</i> | Cocobacilo; Gram negativo; não esporulado | Agente comensal do tracto reproductivo do macho e da fêmea | Baixa % de aborto; MFT | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |
| <i>Leptospira spp.</i> | Pequenas espiroquetas aérobias | Entre hospedeiros pela urina infectada, fluidos da placenta, leite. Vectores animais, ambientais (água) | Variável % de aborto (<30%). 1-4 meses depois da fase aguda | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Cocobacilo; Gram positivo | Feto abortado, placenta e fluidos uterinos; alimento | Baixa % de aborto; MFT | Yaeger & Holler (2007); |

| | | | | |
|---------------------------|--|---|---|--|
| | | e água contaminados | | Givens & Marley (2008) |
| <i>Ureaplasma spp</i> | Organismo pleomórfico; anaeróbio facultativo | Flora normal do tracto reprodutivo. Transmissão venérea | Baixa % de aborto; MFT | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |
| <i>Chlamydomphila spp</i> | Parasitas intracelulares obrigatórios | Ingestão de fezes, urina e materiais contaminados (fluidos nasais, oculares, vulvares, uterinos e placenta) | Baixa % de aborto; ocorre entre o 6º e o 8º mês de gestação | Yaeger & Holler (2007); Givens & Marley (2008) |

Tabela 5. Causas víricas de mortalidade embrionária e fetal.

| Causas víricas | | | | |
|--|--|---|---|---------------------------------------|
| Agente/ Doença | Características do agente | Transmissão | ME / MF | Referência bibliográfica |
| Diarreia viral bovina (BVD) | <i>Pestivirus</i> da família <i>Flaviviridae</i> | Transplacentar; inalação ou ingestão de material contaminado com secreções corporais ou excreções | Variável % de aborto; mortalidade embrionária precoce | Kelling, 2007; Givens & Marley (2008) |
| Rinotraqueíte infecciosa bovina / Herpesvírus bovino (BHV-1) | <i>Herpesvirus</i> bovino tipo 1 Familia <i>Herpesviridae</i> | Contacto directo com as vias respiratórias superiores, conjuntivas, mucosas do tracto genital. Excreção do vírus 8-16 dias após infecção. | Variável % de aborto; mortalidade embrionária; mortalidade fetal média e tardia | Kelling, 2007; Givens & Marley (2008) |
| Língua azul | <i>Orbivirus</i> da família <i>Reoviridae</i> | Vector Culicoides immicula | Baixa % de aborto; Mortalidade embrionária precoce; Infecção após o 150º dia de gestação não tem efeito | Kelling, 2007; Givens & Marley (2008) |

negativo no feto

Tabela 6. Causas parasitárias de mortalidade embrionária e fetal

| Causas parasitárias | | | | |
|---------------------------------------|---|---|--|--|
| Agente/ Doença | Características do agente | Transmissão | ME / MF | Referência bibliográfica |
| Neosporose <i>Neospora caninum</i> | Protozoário subfamília <i>Toxoplasmatinae</i> | Hospedeiro definitivo é o cão; os bovinos ingerem os oocistos esporulados no alimento, água e solo contaminados com fezes de cão. | Variável % de aborto; mortalidade fetal média (5º- 6º meses de gestação) | Canada, Rocha, Meireles & Correia da Costa, 2002; Givens & Marley (2008) |

Para além das causas infecciosas acima consideradas, também é prudente considerar outras, que comprometem sistematicamente os índices reprodutivos.

2.2.3.4.1. Mastite

A infecção da glândula mamária em vacas leiteiras é causada primariamente por bactérias e está associada a uma redução na TG e a um aumento do número de IA necessárias para estabelecer a gestação (Hansen, Soto & Natzke, 2004; Walsh et al., 2011).

Alguns estudos tornaram claro que existe uma correlação entre a mastite e a fertilidade.

Estas observações levaram a que se assumisse a hipótese de que a inflamação e a resposta imunitária à infecção intra-mamária afectariam a performance reprodutiva, reduzindo as taxas de fertilidade por comprometimento do desenvolvimento embrionário e do RMG (Chebel, 2007; Walsh et al., 2011). Uma das explicações possíveis poderá ser a produção de substâncias que afectam a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário, ambiente uterino e função ovárica. Estas substâncias são conhecidas por citocinas e, entre elas, as interleuquinas (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α produzidas a partir das células de glândulas mamárias infectadas (Riollet, Rainard & Poutrel, 2001). Também os componentes da parede celular (lipopolissacáridos, LPS) da *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa) resultam no aumento das concentrações de IL-1 β , IL-8, e TNF- α , no leite (Blum, Dosogene, Hoebe, Vangroenweghe, Bruckmaier & Burvenich, 2000).

2.2.3.4.2. Laminite

A laminite é um processo inflamatório das estruturas sensíveis da parede do casco que resulta num processo doloroso associado a claudicação intensa e a mudanças estruturais do mesmo (Martins, Ferreira, Rosa & Benedette, 2008).

Após vários estudos sobre a influência negativa da laminite na fertilidade, não só pela fraca expressão do cio mas também pela baixa taxa de concepção, Beltman et al. (2009) demonstraram, pela primeira vez, a relação entre o “score” de claudicação e a sobrevivência embrionária, concluindo haver uma clara relação negativa entre os dois parâmetros.

2.2.3.5. Ambientais

2.2.3.5.1. Stress Hipertérmico (SHT)

Nos bovinos, como nas outras espécies, a exposição de fêmeas gestantes ao stress hipertérmico (SHT) durante o período embrionário conduz à ME (Ealy, Drost & Hansen, 1993; Sartori, 2004), nomeadamente durante o período de maturação oocitária ou durante os primeiros estádios de desenvolvimento embrionário (Hansen et al., 2004b).

Um dos aspectos relacionados com o SHT e a sobrevivência embrionária, pelo menos na vaca, é que a magnitude da depressão da sobrevivência embrionária é menor quando o SHT ocorre tardiamente, isto é, no período pré-implantação, relativamente a estádios mais precoces (Ealy et al., 1993; Hansen, 2002). Como exemplo, em vacas sujeitas a TSOV e expostas ao SHT um dia depois da beneficiação observou-se uma redução da proporção de embriões viáveis ao 8º dia (Ealy et al., 1993).

O facto dos embriões bovinos aumentarem a resistência ao SHT à medida que o desenvolvimento progride, levou ao uso da TE como ferramenta de optimização da TG em períodos de SHT. Assim, será de esperar que o SHT tenha menor efeito na sobrevivência embrionária em receptoras que recebem um embrião colhido em período fresco, em comparação com vacas inseminadas, porque tais embriões já ultrapassaram a fase de maior susceptibilidade ao SHT (Ealy et al., 1993; Ambrose et al., 1999; Hasler, 2001; Lucy, 2002; Hansen et al., 2004a).

2.2.3.5.2. Outros tipos de stress

O stress tem um efeito deletério na eficiência reprodutiva dos animais (Dobson & Smith, 1995, citados por Vanroose et al., 2000).

Os factores de stress como transporte, traumatismos, isolamento ou dor afectam a função reprodutiva por via hipotalâmica (GnRH) e/ou ovárica (P₄) (Vanroose et al., 2000). Qualquer tratamento de rotina (desparasitação, por exemplo) deve ter lugar pelo menos três semanas

após a TE e alterações bruscas na alimentação não são aconselhadas três a quatro semanas antes e depois da TE (Gordon, 2002).

A TE não deve ser realizada por operadores inexperientes sob perigo de poderem infligir traumatismos e lesões inflamatórias graves, comprometendo a saúde e bem-estar da receptora e do embrião (Gordon, 2002).

III. ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO DA TAXA DE GESTAÇÃO (EOTG)

3.1. ESTRATÉGIAS DE OPTIMIZAÇÃO DA TAXA DE GESTAÇÃO (EOTG)

Como anteriormente se referiu, o período de maior susceptibilidade à ME coincide com o do RMG, que é o processo pelo qual o embrião sinaliza a sua presença à mãe, bloqueando o mecanismo de síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e, consequentemente, a luteólise (Thatcher, Meyer & Danet-Desnoyers, 1995; Mann & Lamming, 1999; Binelli et al., 2001).

A sinalização da presença intra-uterina do embrião, de forma a inibir a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, está relacionada com a secreção de factores parácrinos, como o $\text{IFN-}\tau$ (Binelli & Thatcher, 1999). Desta forma, o sucesso no estabelecimento da gestação está dependente do eficiente bloqueio da luteólise e da quantidade total de $\text{IFN-}\tau$ produzida pelo embrião (Mann & Lamming, 1999).

As estratégias antiluteolíticas resultam em manipulações farmacológicas, mecânicas, nutracêuticas e de manejo que têm como objectivo o aumento da probabilidade de sucesso de gestação, com uma actuação directa sobre o mecanismo de RMG. Visam tanto a diminuição da capacidade luteolítica da mãe como o aumento do estímulo antiluteolítico de origem embrionária. Podem envolver manipulações das funções folicular, luteínica, uterina e do embrião ou, igualmente, manipulações do ambiente (Binelli et al., 2001; Binelli, Machado, Bergamaschi, da Silva, Ibiapina & Bisinotto, 2006).

3.1.1. Criação de um corpo lúteo (CL) maior a partir do aumento de tamanho do folículo pré-ovulatório

Um corpo lúteo (CL) maior segrega maiores quantidades de P_4 (Binelli et al., 2001; Lonergan, 2011). Porém, Spell et al. (2001) não concluíram o mesmo. Não obstante a controvérsia, esse aspecto tem um efeito positivo no RMG e, consequentemente, na TG (Binelli et al., 2001; Mantovani, Reis, Gacek, Bó, Binelli & Baruselli, 2005; Lonergan, 2011). Assim, estratégias que promovam o crescimento do FD antes da ovulação são vantajosas para a melhoria da TG (Inskeep, 2004; Lonergan, 2011). Classicamente, para obter-se um folículo maior terá de se promover o crescimento deste sobre baixas concentrações de P_4 , de forma que os folículos se mantenham em crescimento (Binelli et al., 2001; Mantovani et al., 2005) no ovário por 15 a 20 dias (Lucy, Savio, Badinga, De La Sota & Thatcher, 1992; Stock & Fortune, 1993). No caso de receptoras de embriões, os oócitos que provenham de folículos persistentes não serão fertilizados. Contudo, como de um FD de grandes dimensões pode obter-se um CL de tamanho correspondente, assume-se que um folículo persistente grande pode gerar um CL grande (Stock & Fortune, 1993; Arnold, Binelli, Vonk, Alexenco, Drost & Thatcher, 1999), resultando em produção mais elevada de P_4 , crucial

para o desenvolvimento do embrião (Stock & Fortune, 1993; Binelli et al., 2001; Inskeep, 2004; Mantovani et al., 2005; Lonergan, 2011).

Moura et al. (2001), citados por Binelli et al. (2001) testaram essa hipótese num grupo de novilhas receptoras com a colocação de um implante auricular de P_4 , no dia 0, seguida da administração de 400 µg de um análogo da $PGF_{2\alpha}$. Ao 9º dia foi injectado o mesmo análogo de $PGF_{2\alpha}$ e ao dia 10 a ovulação foi induzida com BE. Os animais tratados apresentaram folículos de maiores dimensões que resultaram em CL de maior diâmetro e com concentrações plasmáticas de P_4 mais elevadas ao 17º dia.

É de ressaltar que, apesar dos benefícios deste fármaco (BE), o mesmo não está comercialmente disponível em muitos países (Bó et al., 2002).

3.1.2. Optimização da taxa de crescimento do CL

A óptima diferenciação e taxa de crescimento do CL estão relacionadas com a amplitude do pico pré-ovulatório de LH (Binelli et al., 2001). Como se sabe, a elevação dos níveis de E_2 , depois do decréscimo de P_4 no fim do ciclo éstrico, irá induzir um pico pré-ovulatório de LH. O E_2 actua no hipotálamo de forma a aumentar a secreção de GnRH (Gordon, 2002). A indução de picos de LH pode ser conseguida com a administração de GnRH em protocolos “Ovsynch”, que são de menor duração quando comparados com os picos naturais, o que pode condicionar o crescimento óptimo do CL. Depois da administração, em vacas Holstein, de um implante com um agonista da GnRH, em comparação com a administração de outro agonista do mesmo péptido, mas sob a forma de *bolus*, concluiu-se que os implantes de libertação prolongada de GnRH induziam picos de LH de maior duração, resultando na estimulação do crescimento e funcionalidade do CL (Ambrose, Pires, Moreira, Diaz, Binelli & Thatcher, 1998).

3.1.3. Estimulação da fase lútea

Vários métodos já foram utilizados para melhorar a TG, através do aumento das concentrações plasmáticas de P_4 , durante a fase lútea (Binelli et al., 2001).

Assim, o aumento das concentrações plasmáticas de P_4 pode ser conseguido com a indução de um CL acessório (Binelli et al., 2001; Mantovani et al., 2005). No 5º dia do ciclo éstrico, as células da granulosa do FD contêm receptores para LH e, desse modo, a hCG poderá provocar a ovulação e induzir a formação do CL acessório (Shams-Esfandabadi, Shirazi, Mirskokrai & Bonyadian, 2007). A injeção de hCG estimula a formação de um CL acessório (Santos et al., 2001; Chagas e Silva & Lopes de Costa, 2005; Machado, Bergamaschi, Barbosa, de Oliveira & Binelli, 2008; Stevenson, Tiffany & Inskeep, 2008;

Shabankareh et al., 2010; Rossetti et al., 2011). Existindo outros tratamentos disponíveis, assume-se que a aplicação de hCG conduz a uma maior produção de P_4 e ao aumento do volume do CL espontâneo. Assim sendo, para além dos benefícios atrás referidos, esta gonadotrofina pode exercer um efeito luteotrófico estimulando directamente a produção de P_4 (Binelli et al., 2001).

Outra possibilidade de estimulação da produção de maiores quantidades de P_4 durante a fase lútea é através de injeções de eCG. A eCG possui uma actividade FSH e LH em simultâneo. A administração de eCG durante a fase de emergência folicular sincronizada pode aumentar a percentagem de folículos em crescimento, resultando em mais e maiores folículos pré-ovulatórios. Maiores folículos resultam em CL maiores (Ambrose et al., 1998). Esta gonadotrofina estimula pois o crescimento em simultâneo de múltiplos folículos, que são, por sua vez, induzidos a ovular e a formar múltiplos CL, sendo de esperar concentrações de P_4 mais elevadas após a ovulação (Arnold, Binelli, Vonk, Alexenco, Drost & Thatcher, 1999).

Um elemento a considerar aquando do uso de eCG e hCG, em programas antiluteolíticos, prende-se com o facto da eficiência destas poder ficar comprometida com o uso repetido na mesma vaca, devido à facilidade de formação de anticorpos (Binelli et al., 2001).

3.1.4. Atenuação da influência do folículo dominante (FD)

A eliminação ou atenuação do tamanho do folículo durante a fase crítica do RMG pode resultar na diminuição das concentrações circulantes de E_2 e consequentemente na diminuição do estímulo luteolítico associado ao E_2 . (Binelli et al., 2001; Robinson, Mann, Lamming & Wathes, 2001). Estratégias que minimizem o crescimento folicular durante o período de manutenção do CL podem reduzir a perda gestacional em vacas leiteiras (Santos, Thatcher, Chebel, Cerri & Galvão, 2004). Uma injeção estratégica de GnRH poderá modificar funcionalmente o FD eventualmente presente nesta fase, reduzindo as suas concentrações de E_2 e favorecendo o RMG (Binelli et al., 2001). A substituição da injeção de GnRH pela colocação de um implante auricular impregnado de um seu agonista, suprimiu a actividade folicular e melhorou a manutenção da gestação (Santos, Cerri, Ballou, Higginbotham & Kirk, 2004).

A utilização do efeito da hCG (formação de CL acessório) para alterar o desenvolvimento folicular poderá atrasar a luteólise e, com isso, melhorar a fertilidade. A ovulação no dia 5 após o tratamento resultará na emergência de uma nova onda folicular no dia 6 e na provável alteração do FD antes da luteólise. Assim, a vaca desenvolverá, possivelmente, um padrão de 3 ondas foliculares, em vez de 2 (Wiltbank et al., 2011). Essa alteração poderá induzir uma melhoria na fertilidade (Townson et al., 2002). A ausência de E_2 circulante

produzido pelo FD, por volta do período crítico, irá atrasar a luteólise até ao momento em que aquele esteróide esteja presente em quantidade suficiente para que haja produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero (Araujo, Ginther, Ferreira, Palhao, Beg & Wiltbank, 2009).

3.1.5. Aumento do estímulo antiluteolítico

Durante o período do RMG, o embrião está em crescimento rápido. Embriões pequenos poderão não produzir quantidades apropriadas de IFN- τ para bloquear com sucesso a luteólise. Por consequência, a gestação é interrompida caso o embrião seja incapaz de enviar os sinais antiluteolíticos adequados ao endométrio materno (Mann et al., 1999; Mann & Lamming, 2001). Uma das formas de prevenir essas perdas assenta na administração de IFN- τ , durante esse período (Binelli et al., 2001). A infusão intrauterina diária de IFN- τ recombinante do 14º ao 24º dia prolongou o tempo de vida útil do CL e a duração do ciclo éstrico. Contudo, não existe evidência de que essa metodologia tenha sucesso ou que a via de administração seja de fácil execução em termos de rotina (Meyer et al., 1995).

3.1.6. Diminuição da resposta luteolítica materna

A inibição específica dos mecanismos de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero, durante o período crítico, deverá aumentar a eficiência do RMG. Uma das formas de o conseguir é através do tratamento da receptora com AINES, como a flunixinina meglumina (FM) (Binelli et al., 2001; Purcell et al., 2005; Hasler, 2010a), o meloxicam ou o ibuprofeno (Elli et al., 2001).

Relativamente à biossíntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$ proposta por Burns et al. (1997), o AA é convertido em PGH_2 pela enzima COX-2. Os fármacos anti-inflamatórios como a FM, que inibem a síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$ reprimindo o efeito da enzima COX-2, têm demonstrado efeitos positivos sobre a TG (Binelli et al., 2001; Thatcher et al., 2001).

A administração de inibidores da síntese de prostaglandinas provoca efeitos neutralizadores sobre a OT, o que também favorece a TG (Thatcher et al., 2001).

Purcell et al. (2005) testaram o efeito da administração da FM no dia da TE e obtiveram resultados relativamente superiores, comparativamente ao grupo não tratado.

3.1.7. Nutrição

Muitos dos sinais metabólicos e endócrinos envolvidos nos processos reprodutivos são regulados nutricionalmente (Santos et al., 2004b). A suplementação da dieta dos bovinos com 2-4% de gordura influencia positivamente a energia e o estado reprodutivo destes (Staples, Burke & Thatcher, 1998). O reconhecimento da capacidade de alguns ácidos

gordos de modularem a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células endometriais foi sugerido como possibilidade contributiva para a melhoria da sobrevivência embrionária em bovinos (Mattos, Staples & Thatcher, 2000) e foi igualmente demonstrado que alimentos ricos em ácidos gordos ω -3 melhoravam o processo reprodutivo (Burke, Staples, Risco, De La Rota & Thatcher, 1997).

3.1.8. Transferência de dois embriões

Quando são transferidos dois embriões para cada receptora a TG é de 60-90%, com 40-60% de sobrevivência embrionária. No entanto, elas raramente são realizadas em termos comerciais, em virtude dos riscos de distócias e/ou do free-martinismo (quando os embriões não são sexados). A bissecção (“splitting”) dos embriões por micromanipulação poderá ultrapassar este último problema (The Merck Veterinary Manual Online, 2012). Como já foi referido, num estudo realizado por Chagas e Silva et al. (2008), ficou demonstrado que a ME foi significativamente maior em hemi-embriões, quando comparados com embriões inteiros.

3.2. FÁRMACOS E OUTRAS ESTRATÉGIAS COM ACÇÃO DIRECTA SOBRE A TG EM PROGRAMAS DE IA E TE

3.2.1. Meloxicam

O Meloxicam [(4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina 3-carboxamida-1,1-dioxido)] é um AINE da classe oxicam, com acção preferencialmente inibitória da síntese da COX-2. Os efeitos farmacológicos primários incluem acção anti-inflamatória, anti-exsudativa, analgésica e antipirética em várias espécies animais. Nos bovinos tem sido usado no tratamento de infecção respiratória aguda, mastite aguda e diarreia (Hirsch & Philipp, 2009). Após a determinação do perfil plasmático, demonstrou-se que a concentração máxima do fármaco é atingida 4 horas após o início do tratamento. Tendo sido igualmente determinado o seu tempo médio de vida no plasma de aproximadamente 17,5 horas (EMA, 1999) e uma duração máxima do efeito até 72 horas (Erdem & Guzeloglu, 2010).

É racional especular-se acerca dos possíveis efeitos da medicação com meloxicam sobre os parâmetros reprodutivos, antes e durante a gestação (Hirsch & Philipp, 2009).

Do grupo dos AINES, o meloxicam tal como o carprofeno, têm mostrado ser mais selectivos para a inibição da COX-2 que a FM ou a fenilbutazona (Beretta, Garavaglia & Cavalli, 2005). Num estudo realizado em novilhas, a aplicação do meloxicam provocou um decréscimo dramático da TG, comparativamente ao grupo não tratado. A possível explicação parece

residir na duração do efeito inibitório do fármaco sobre a actividade da COX-2. Tendo em consideração que o tempo de vida do meloxicam é relativamente longo e que a administração foi feita 15 dias após a IA, tal situação levou a que a inibição da COX-2 durasse pelo menos até ao dia 18. Concluiu-se então que a actividade de inibição interferiu com o processo de pré-implantação do embrião, causando MEP (Guzeloglu & Erdem, 2006; Erdem & Guzeloglu, 2010).

Hirsch e Philipp (2009) testaram o efeito deste fármaco em vacas leiteiras, quando administrado ao 13º dia pós-IA, e concluíram que o mesmo não influenciava a duração da gestação.

3.2.2. Flunixinina meglumina (FM)

A FM é outro fármaco do grupo dos AINE e eficiente inibidor da síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$ através da sua acção directa sobre as COX-2 (Hasler, 2010a; Rossetti et al., 2011), impedindo a conversão do AA em PGH_2 (Odensvik, Gustafsson & Kindahl, 1998). Com ensaios efectuados tanto em programas de IA, com o tratamento a ser efectuado entre o 14º dia e o 16º, resultando em boas TG (Merrill, Ansotegui, Burns, Macneil & Geary, 2007), como também em programas de TE (Purcell et al., 2005), com TG superiores relativamente ao grupo não tratado. Neste último ensaio, o tratamento foi realizado com a aplicação de 500 mg de FM no momento da TE (Purcell et al., 2005). Em outro ensaio Cardoso et al. (2009) obtiveram resultados opostos.

Sendo a dose recomendada 1,1 mg/Kg em duas injeções espaçadas por um intervalo de 12 horas (Guzeloglu, Erdem, Saribay, Thatcher & Tekeli, 2007), Rossetti et al. (2011) equacionaram a administração de 2,2 mg/Kg do fármaco no dia 16, não tendo sido obtidos resultados significativos, quer relativamente à TG quer às concentrações plasmáticas de P_4 . Foi ainda considerada a hipótese de envolvimento de factores de stress, como a manipulação animal após a IA. Estes factores de stress poderão induzir a ME. Quanto ao possível envolvimento do AINES, especulou-se que este aumentaria o intervalo de tempo entre a ovulação e a luteólise, acentuando as diferenças entre animais tratados e não tratados (Rossetti et al., 2011).

Outros estudos reportaram um aumento do intervalo entre a ovulação e a luteólise, sugerindo que a FM provoca o atraso naquele processo (Odensvik, Gustafsson & Kindahl, 1998).

3.2.3. GnRH

A GnRH é uma hormona produzida pelo hipotálamo que controla a síntese de LH e FSH a partir da hipófise. A acção combinada destas duas últimas hormonas regula o desenvolvimento folicular, a ovulação e a função lútea (Douglas, 1998). Parece improvável que o tratamento com esta hormona possa conduzir ao aumento das concentrações de P_4 e à formação de um CL acessório. Acredita-se que o principal efeito desta reside no facto de actuar sobre um mecanismo antiluteolítico, atenuando o do sinal luteolítico da progenitora (Mann & Picton, 1995, citados por Gordon, 2002).

Num estudo publicado por Mussard, Burke, Behlke, Gasser & Day (2007), com o objectivo de se obter a ovulação prematura do FD, a GnRH reduziu o tamanho dos folículos ovulatórios, reduziu a fertilidade e provocou a diminuição da função lútea subsequente.

Noutro estudo com recurso à IA, realizado por Anjum, Usmani, Tunio & Abro (2009) concluiu-se que a TG foi superior no grupo tratado (68,7%) em relação ao grupo sem tratamento (37,5%). Stevenson et al. (2008) não conseguiram prevenir a perda gestacional com o tratamento tanto com GnRH ou hCG. Em oposição, num programa de TE, com a administração de 5 mL de uma GnRH sintética contendo 0,1 mg/mL, no dia da TE observou-se uma diminuição de 7,9% da TG, relativamente ao grupo não tratado (Smith & Grimmer, 2002).

3.2.4. Dispositivos intravaginais de P_4

Uma outra abordagem para melhorar a sobrevivência embrionária em bovinos tem sido a suplementação directa com progesterona ou progestagénios (P_4). Porém, a administração de P_4 entre a fase lútea inicial e a média do ciclo éstrico não melhorou de forma consistente a TG (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012). Todavia, noutro estudo em que um dispositivo de libertação contínua de P_4 foi inserido por 6 a 12 dias, começando-se entre o dia 5 e o dia 7 (dia 0=estro), registou-se um aumento significativo da TG (79%) em comparação com o grupo não tratado (66%) (Macmillan, Taufa, Day & Peterson, 1991).

O uso de dispositivos intravaginais de P_4 reduz a mortalidade embrionária precoce (MEP) (Lopez-Gaitus, Santolaria, Yaniz & Hunter, 2004) e incrementa o crescimento do embrião nos primeiros estádios de desenvolvimento (Mann, Fray & Lamming, 2006; Carter et al., 2008 citados por Forde et al., 2011). A suplementação com P_4 após IA também melhora a TG (Walton, Halbert, Robinson & Leslie, 1990; Mann & Lamming, 1999). No entanto, todos esses trabalhos têm revelado resultados inconsistentes (Thatcher et al., 2001).

No que se refere ao uso deste tipo de dispositivo em programas de TE, Looney et al. (2006) testaram a sua eficácia quando aplicados no dia da TE, em bovinos de corte, tendo obtido

um aumento não muito significativo da TG, em relação ao grupo não tratado. Já noutro trabalho, com a inserção do dispositivo de P₄ após a TE, não foi registada qualquer redução da MEP (Purcell, Beal & Gray, 2005). Chagas e Silva et al. (2008) também concluíram não haver um efeito sobre a sobrevivência embrionária com este tipo de estratégia.

3.2.5. Gonadotrofina corónica humana (hCG)

A hCG é uma hormona com actividade semelhante à LH (Machado et al., 2008) e é considerada uma alternativa para o aumento das concentrações de P₄ e redução das concentrações estrogénicas durante o RMG (Sianangama & Rajamahendran, 1992). É capaz da indução de um CL acessório (Kerbler et al., 1997; Thatcher et al., 2001; Thatcher, Moreira, Pancarci, Bartolome & Santos, 2002; Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005; Machado et al., 2008; Stevenson et al., 2008; Shabankareh et al., 2010; Rossetti et al., 2011) após administração entre o dia 4º e o 7º dia pós-cio (Machado et al., 2008) ou no 7º dia (Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005). O CL induzido promove um aumento da P₄ para níveis superiores aos observados com a injeção de GnRH (Schmitt et al., 1996).

Estudos realizados em programas de IA (Sianangama & Rajamahendran, 1992; Santos et al., 2001; Thatcher et al., 2002; Stevenson et al., 2007; Shabankareh, Zandi & Ganjali, 2010; Rossetti et al., 2011) e de TE (Nishigai, Kamomae, Tanaka & Kaneda, 2002; Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005; Stevenson et al., 2008; Wallace et al., 2011) registaram um aumento da TG (Kerbler et al., 1997; Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005; Shabankareh et al., 2010; Wallace et al., 2011). Assim, o aumento da concentração de P₄ promovido por esta hormona (Sianangama & Rajamahendran, 1992; Kerbler et al., 1997; Thatcher et al., 2001; Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005; Stevenson et al., 2008; Shabankareh et al., 2010) pode resultar no acréscimo da produção de IFN- τ pelo embrião (Kerbler et al., 1997; Stevenson et al., 2008) e, apesar de os resultados serem contraditórios (Stevenson et al., 2008), esse tratamento reduziu nas receptoras a MEP pós-TE (Wallace et al., 2011), mas não afectou a MET e a perda fetal (Stevenson et al., 2008).

3.2.6. Gonadotrofina coriónica equina (eCG)

É conhecido o uso da eCG em programas de OMTE, com diversos objectivos, revelando características fisiológicas e farmacológicas únicas (Dieleman, Bevers, Vos & de Loos, 1993; Mapletoft, Steward & Adams, 2002; Mapletoft, 2006).

Novilhas tratadas com 400 UI de eCG, 12 dias antes da TE, revelaram um aumento do número de CL acessórios e da concentração de P₄ na altura da TE e uma TG superior, ao grupo não tratado (Nasser, Reis, Oliveira, Bó & Baruselli, 2004).

A sua administração revelou ainda um aumento da P₄ no 14º dia (Kenyon et al., 2012). Estes autores especularam ainda que esse aumento da P₄ no 14º dia e durante o intervalo entre o 7º e o 14º dia seria mais importante para a sobrevivência do embrião transferido do que a sua concentração ao 7º dia.

3.2.7. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um AINE com um número variado de propriedades, incluindo acção analgésica e antipirética. Estas acções foram descritas para situações agudas e traumáticas (Elli et al., 2001). A maior parte dos efeitos deste fármaco foi atribuído à sua capacidade de prevenção da secreção de prostaglandinas através da inibição da produção das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) (Elli et al., 2001; Hasler, 2010a).

No entanto, a partir do momento em que são gerados os produtos resultantes da actividade das COX, produzidos localmente no útero, a receptividade do endométrio poderá ficar afectada (Rubinstein, Marazzi & deFried, 1999).

Elli et al. (2001) concluíram que a implantação e as TG foram significativamente superiores em novilhas que receberam ibuprofeno durante vários ciclos de TE. Com uma dose de 5 mg/Kg p.v., administrada um hora antes da TE congelados obtiveram uma TG de 82% no grupo tratado, enquanto que o grupo controlo registou 56% (Elli et al., 2001).

3.2.8. Somatotropina recombinante bovina (rbST)

Foi demonstrado que vacas tratadas com rbST durante o estro tiveram melhores TG (Moreira, Badinga, Burnley & Thatcher, 2002; Thatcher et al., 2003) e estimulação do desenvolvimento embrionário (Thatcher et al., 2003; Thatcher, Bilby, Bartolome, Silvestre, Staples & Santos, 2006). Os receptores para a bST e para o IGF-1 são expressos no endométrio bovino, especialmente nas suas glândulas (Wathes, Reynolds, Robinson & Stevenson, 1998). Moreira et al. (2002a) sugerem que o aumento das concentrações do IGF-1 em resposta ao tratamento com bST eleva a actividade secretora das glândulas endometriais, conduzindo à criação de um ambiente uterino favorável ao desenvolvimento do embrião e facilitando a manutenção da gestação (Moreira et al., 2002a). Tem ainda actividade comprovada sobre o crescimento do embrião (Moreira et al., 2002a; Moreira, Paula-Lopes, Hansen, Badinga & Thatcher, 2002; Santos, Juchem, Cerri, Galvao, Chebel & Thatcher, 2004).

A administração da rbST (*in vivo* e *in vitro*), demonstrou não ter efeito sobre TG quando às receptoras foi administrada a rbST na altura da TE. Novilhas receptoras de embriões produzidos *in vitro* tiveram menor TG que outras a quem foram colocados embriões

produzidos *in vivo*. Para além disso, a correlação entre o tratamento e o tipo de embrião não foi significativa (Hasler et al., 2003).

3.2.9. Interferão-tau recombinante bovino (rbIFN- τ)

A injeção intrauterina de IFN- τ recombinante ovino (roIFN- τ) ou bovino (rbIFN- τ) duas vezes por dia, do 14º ao 24º dia do ciclo éstrico, prolongou o tempo de vida útil do CL e atenuou a possível actividade da oxitocina no que se refere à sua interferência na secreção de PGF_{2 α} , em vacas leiteiras, não causando resposta hipertérmica (Meyer et al., 1995). A cultura de células epiteliais do endométrio no 15º dia do ciclo éstrico revelou que o rbIFN- τ diminuiu a secreção de PGF_{2 α} , tanto na presença como na ausência da oxitocina (Danet-Desnoyers, Wetzels & Thatcher, 1994, citados por Thatcher et al., 2003). Barros et al. (1992) registaram um decréscimo na TG, quer após a administração diária de 20 mg de bIFN- τ entre o 14º e o 17º dia quer com a injeção de uma dose de 40 mg do mesmo, no 13º dia, ou ainda com a administração crescente de bIFN- τ , crescente, de 0,01 a 10 mg, entre o 11º e o 19º dia pós IA. Embora uma pequena percentagem de vacas possa não responder ao tratamento, o IFN- τ tem bom potencial no que se refere à melhoria da fertilidade (Bilodeau-Goeseels & Kastelic, 2012), resultado este que não foi confirmado por Barros, Newton, Thatcher, Drost, Plante & Hansen (1992).

Apesar dos seus benefícios, o custo da sua utilização em programas comerciais de TE não ser economicamente viável.

3.2.10. Vesículas trofoblásticas (VT)

As estruturas denominadas vesículas trofoblásticas (VT) são conhecidas por serem similares em muitos aspectos aos blastocistos sem disco embrionário, podendo serem obtidas por micromanipulação de embriões com 13 a 14 dias de idade. São realizados cortes e cultura *in vitro* por 24 horas, até à formação de vesículas (Gordon, 2002).

Segundo Gordon (2002) é vantajosa a utilização de VT para a melhoria da TG, podendo as mesmas ser transferidas juntamente com o embrião, de forma a potenciarem o sinal antiluteolítico deste último.

3.2.11. IGF-1

O IGF-1 tem sido associado à produção de embriões viáveis durante TSOV. Contudo, poderá haver um limiar de concentração do mesmo a determinar, que poderá afectar a embriogénese. Esse efeito negativo está associado a RSOV muito expressivas que levam

ao aumento dos níveis de E_2 , actuando indirectamente sobre a viabilidade dos embriões através da sua influência na qualidade do oócito durante o desenvolvimento folicular e durante o período pré-implantação (Velazquez, Zaraza, Oropeza, Webb & Niemann, 2009).

Num estudo de produção de embriões bovinos *in vitro* concluiu-se que a suplementação dos meios de cultura com IGF-1 melhorava substancialmente a capacidade de desenvolvimento embrionário, conduzindo a um aumento da TG pós-TE (Block & Hansen, 2007)

No entanto, outros autores não registaram qualquer vantagem neste tratamento (Block, Wrenzycki, Niemann, Herrmann & Hansen, 2008). Diferenças no meio de cultura, suplementação proteica ou nas concentrações de IGF-1 podem estar na origem da explicação para as diferenças observadas (Velazquez, Zaraza, Oropeza, Webb & Niemann, 2009).

3.2.12. Propilenoglicol (PPG)

O propilenoglicol (PPG) é um precursor da gliconeogénese muito utilizado no combate à cetose, aumentando a percentagem molar de propionato ruminal no pós-parto de vacas leiteiras (Christensen, Grummer, Rasmussen & Bertrics, 2004). O propionato é transportado até ao fígado através do sistema porta, onde é transformado em piruvato e eventualmente em glicose (Moore & Ishler, 1997). É sabido que as concentrações de glicose e insulina após a administração de PPG aumentam, mas o mecanismo subjacente a este facto não está bem esclarecido (Struder, Grummer & Reynolds, 1993).

Foi sugerido que o propionato ou produtos intermédios do metabolismo do PPG podem estimular a secreção pancreática de insulina, o crescimento folicular e a diferenciação, o que pode exercer efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário (Telfer, Webb, Moor & Gosden, 1999). Animais que receberam doses orais de PPG também revelaram aumento da concentração de IGF-1 (Struder et al., 1993). Nos bovinos, o IGF-1 tem pois, efeitos sobre a foliculogénese, a ovulação, a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a implantação (Lucy, 2000).

Hidalgo et al. (2004) estudaram o efeito do PPG sobre a TG após TE em novilhas Holstein, com embriões descongelados. A administração foi realizada oralmente 20 dias antes da TE e os resultados ao tratamento foram: aumento dos níveis de P_4 , aumento da qualidade do CL e aumento da TG (64%, em comparação com o grupo não tratado, com aproximadamente 43%), não tendo sido atribuída a melhoria da TG apenas ao aumento dos níveis de P_4 , mas também a outros possíveis factores metabólicos.

IV. TRABALHO EXPERIMENTAL

4.1. INTRODUÇÃO

A fisiologia reprodutiva dos bovinos de leite tem sofrido alterações significativas durante as últimas décadas, relacionadas com o aumento da ingestão de alimento e o aumento da produção de leite (Wiltbank, Lopez, Sartori & Sangsritavong, 2006). A TE é uma ferramenta útil para a melhoria da probabilidade de concepção nos bovinos (Demetrio, Santos, Demetrio & Vasconcelos, 2007). Esta tecnologia reprodutiva de 2ª geração (Thibier, 2005) tem actualmente uma expressão mundial muito significativa e todo um potencial de sucesso devidamente comprovado (Mapletoft & Hasler, 2005).

Nos bovinos, para que haja ocorrência de gestação, o embrião bovino terá de ser capaz de sinalizar a sua presença através da secreção de IFN- τ , durante o chamado período crítico (entre o 14º e o 16º dia de gestação), promovendo a manutenção de produção de P_4 pelo CL e evitando a luteólise (Mann & Lamming, 1999; Binelli et al., 2001; Mann & Lamming, 2001; Thatcher et al., 2001a). Uma sub-função lútea com quebra de produção de P_4 pode resultar de uma debilidade da comunicação entre o embrião e o útero materno (Machado et al., 2010).

A ME representa a maior limitação para a fertilidade no sistema de produção leiteiro moderno (Mann & Lamming, 1999; Thatcher et al., 2001a; Gordon, 2002), comprometendo a rendibilidade das explorações pecuárias (Chagas e Silva, 2007; Machado, Bergamaschi, da Silva & Binelli, 2010). A MEP assume maior expressão próximo do momento do RMG (Thatcher et al., 2001a; Diskin & Morris, 2008; Machado et al., 2010; Lonergan, 2011; Diskin et al., 2012), tendo a MET menores percentagens de incidência, com 5 a 10% de ocorrência após IA (Mann & Lamming, 1999). No que se refere à TE, com o uso de embriões descongelados, pressupõe-se o registo de quebras da TG (Hasler, 2001; Spell, Beal, Corah & Lamb, 2001; Chebel et al., 2008), que se quedando pelos 50% (Thibier, 2005).

Vários estudos registam a adopção de estratégias com o objectivo de melhoria das TG recorrendo ao uso de hormonas e outros fármacos, tanto na IA como na TE (Hasler, 2010). Estas estratégias visam a diminuição da capacidade luteolítica da progenitora e o aumento do estímulo antiluteolítico desenvolvido pelo embrião (Binelli et al., 2001; Binelli et al., 2006). Assim, os objectivos do presente ensaio foram: a) avaliar o efeito da administração de meloxicam no dia anterior à TE sobre a TG, procurando que as propriedades anti-inflamatórias do mesmo, pudessem atenuar atempadamente os processos inflamatórios causados por traumatismos e pelas manipulações inerentes à TE; b) avaliar o efeito da administração de meloxicam sobre a TG, 7 dias após o dia da TE, utilizando a selectividade deste fármaco para a COX-2, e atenuar a produção de $PGF_{2\alpha}$ no período crítico; c) avaliar o efeito da administração de hCG no dia anterior à TE sobre a TG, esperando a formação de um CL acessório, o aumento das concentrações de P_4 e a mitigação da produção de E_2 pelo

FD; d) avaliar o efeito do tempo de TE sobre a TG, pelo facto de manipulações do tracto reprodutivo, por si só, levarem à síntese de PG e na TE haver o risco de manipulações demoradas poderem interferir com o desenvolvimento e viabilidade embrionária.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Delineamento experimental

Este ensaio foi desenvolvido na Região Autónoma dos Açores, com distribuição geográfica por quatro ilhas pertencentes ao Grupo Central, com condições climáticas e orográficas muito idênticas: na ilha Graciosa, onde decorreram a maior parte das TE, no Pico, Faial e Terceira.

4.2.1.1. Animais e meio ambiente

Os animais estudados constituem uma amostra de conveniência em que a selecção foi realizada de acordo com os programas de trabalho e de estudo do Orientador naquelas regiões.

No estudo estiveram envolvidas 100 novilhas receptoras da raça Frísia Holstein, tendo sido possível contabilizar 48 animais com registos completos de idade e CC (Tabelas 7 e 8). No período que antecedeu o programa de TE os animais foram mantidos em regime de pastoreio, com razoável disponibilidade de forragem, não tendo sido observado quaisquer fenómenos meteorológicos pouco habituais que pudessem comprometer o programa. Todas as fêmeas estiveram sujeitas a um sistema de manejo geral muito semelhante (Chagas e Silva, 2009).

Tabela 7. Análise descritiva da amostra relativa a idade e peso.

| Variáveis | N | Média | Desvio padrão (DP) |
|---------------------|----------|--------------|-------------------------------|
| Idade (anos) | 65 | 1,38 | 0,23 |
| Peso (kg) | 6 | 323,33 | 36,96 |

Tabela 8. Análise descritiva da amostra relativa a condição corporal (CC).

| Variáveis | N | Média | Mediana | DP |
|-----------|----|-------|---------|------|
| CC | 80 | 2,70 | 2,75 | 0,27 |

4.2.1.2. Profilaxia médica e sanitária

As novilhas sujeitas à TE (n = 100) foram desparasitadas com Febendazole (7,5 mg/kg de peso vivo, administrados por via oral, em dose única, Panacur® Suspensão 10%, MSD, Holanda), vacinadas contra o IBR/IPV com a vacina viva e marcada Bovilis® IBR (2 mL de vacina reconstituída, administrados por via IM, MSD, Holanda) e sujeitas a uma colheita de sangue para pesquisa do antigénio BVD para a identificação e eliminação de animais persistentemente infectados.

Estas intervenções ocorreram sempre a mais de 3 semanas da data das transferências.

4.2.1.3. Selecção das novilhas para TE

As fêmeas foram seleccionadas para o programa de sincronização deaios em função da sua CC (Tabela 8) e ciclicidade (só foram aprovadas as fêmeas cíclicas). As novilhas foram, na sua totalidade, sujeitas a um exame do estado geral e a exame ginecológico por PTR, não tendo nenhuma das fêmeas envolvidas apresentado anomalias reprodutivas. Os animais que não obedecerem a este escrutínio foram eliminados, de forma a evitar que, de alguma forma, pudessem comprometer a TE.

4.2.1.4. Método de sincronização e detecção deaios

O método usado para sincronização deaios das receptoras foi o da dupla administração de um análogo de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Veteglan, 2 mL, via IM, Laboratórios Calier, Espanha) com 11 dias de intervalo, e posterior observação de cio 48 horas após a segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$. A detecção visual das fêmeas em cio foi da responsabilidade dos produtores envolvidos no programa.

4.2.1.5. Embriões

No total foram efetuadas 100 transferências com embriões descongelados, tendo estes idades compreendidas entre 6 e 7,5 dias, apresentando morfologia excelente-boia (1). Quanto ao desenvolvimento embrionário, foram transferidas mórulas compactas (n=83), jovens blastocistos (n=13) e blastocistos (n= 4).

Todos os embriões usados no presente trabalho, foram congelados com EG para TD com recurso a um congelador de embriões pré-programado para uma curva de arrefecimento lenta.

4.2.1.6. Tratamento

No dia anterior à TE procedeu-se à avaliação das receptoras (exame de estado geral e exame ginecológico por PTR), nomeadamente localização e avaliação do CL, procedimento este realizado sempre pelo mesmo técnico que executou as TE, de forma a minorar o risco de erro aleatório. As receptoras aprovadas para TE, foram distribuídas aleatoriamente pelos seguintes Grupos: Grupo controlo (n=48; sem tratamento); Grupo Meloxicam D6 (D0= estro) (n=15; 8,5 mL de meloxicam, via SC; Metacam®, Boehringer Ingelheim, Alemanha); Grupo Meloxicam D14 (D0= estro) (n=19; 8,5 mL de meloxicam, via SC; Metacam®, Boehringer Ingelheim, Alemanha); e Grupo hCGD6 (D0= estro) (n=18; 1500 UI hCG, via IM, Chorulon®, MSD, Holanda). O custo orçado do tratamento foi de 7,60€ (euros) no meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Alemanha) e de 6,90€ na hCG (Chorulon®, MSD, Holanda).

4.2.1.7. Procedimento de TE e DG

As TE foram realizadas por via não-cirúrgica, sempre pelo mesmo técnico, tendo apenas sido validadas, para este estudo, as transferências atraumáticas e com boa colocação embrionária (ausência de vestígios de sangue na extremidade anterior do “pistolet” e deposição do embrião no terço cranial do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL).

No dia da TE, as receptoras foram sujeitas a uma anestesia epidural baixa (5mL de Lidocaína a 2%, Anestésin, Laboratório Sorológico, Portugal), após dar-se início ao processo de descongelação da palhinha contendo o embrião.

O protocolo de descongelação da palhinha consistiu na remoção da palhinha do contentor de azoto líquido, mantendo-a 10 segundos à temperatura ambiente e, posteriormente, outros 10 segundos mergulhada em banho-maria à temperatura de 35°C. Da remoção da palhinha do contentor até ao final da transferência o tempo mediano foi 7 minutos (Tabela 11).

Decorridos 30 a 35 dias da TE, foi realizado o diagnóstico de gestação por PTR pelo mesmo operador que realizou a transferência.

4.2.2. Análise estatística

Para a realização deste ensaio, todos os dados foram recolhidos durante os programas de OMTE e de TE. Os mesmos foram armazenados e tratados no programa informático Microsoft Office Excel 2007, a partir do qual foram elaboradas algumas das tabelas.

Foi estudada, pelo teste exacto de Fisher bilateral, a possibilidade de associação entre as seguintes variáveis: “Tratamento” *versus* “DG” para o total dos animais. Foi utilizado o mesmo teste para comparar a diferença entre os grupos “Tratado” e “Não tratado” *versus* “DG” e o “Tempo de TE” foi comparado entre novilhas gestantes e não gestantes pelo teste de Mann-Whitney U. A análise estatística dos dados foi realizada no programa *IBM SPSS Statistics 19* para Windows.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Relação entre o tratamento efectuado e o DG

A tabela 9 apresenta o número de animais relativos aos vários grupos de tratamento e as respectivas TG. Foi utilizando o teste exacto de Fisher bilateral para se estudar o efeito do tratamento e a TG, verificando-se que não foram encontradas, entre os vários grupos, diferenças significativas ($p=0,907$).

Tabela 9. Caracterização da população de acordo com o tipo de tratamento e respectiva TG.

| Grupo / Tratamento | Gestante | Não gestante | Total | TG (%) |
|-----------------------|----------|--------------|-------|--------|
| Controlo | 31 | 17 | 48 | 64,58% |
| hCG 1500UI | 10 | 8 | 18 | 55,55% |
| Meloxicam D6 | 10 | 5 | 15 | 66,66% |
| Meloxicam D14 | 12 | 7 | 19 | 63,15% |

4.3.2. Relação entre grupos tratados *versus* grupos não tratados e DG

A tabela 10 sumariza o número de animais com e sem tratamento e o resultado do DG. Com o recurso ao teste exacto de Fisher bilateral, estes dados não evidenciaram diferenças significativas ($p=0,837$) entre as TG do grupo tratado e o não tratado.

Tabela 10. Caracterização da amostragem de acordo com o grupo de tratamento e DG.

| Grupos | DG | | Total | TG |
|----------------|--------------|----------|-------|--------|
| | Não gestante | Gestante | | |
| Com tratamento | 20 | 32 | 52 | 61,53% |
| Sem tratamento | 17 | 31 | 48 | 64,58% |
| Total | 37 | 63 | 100 | 63% |

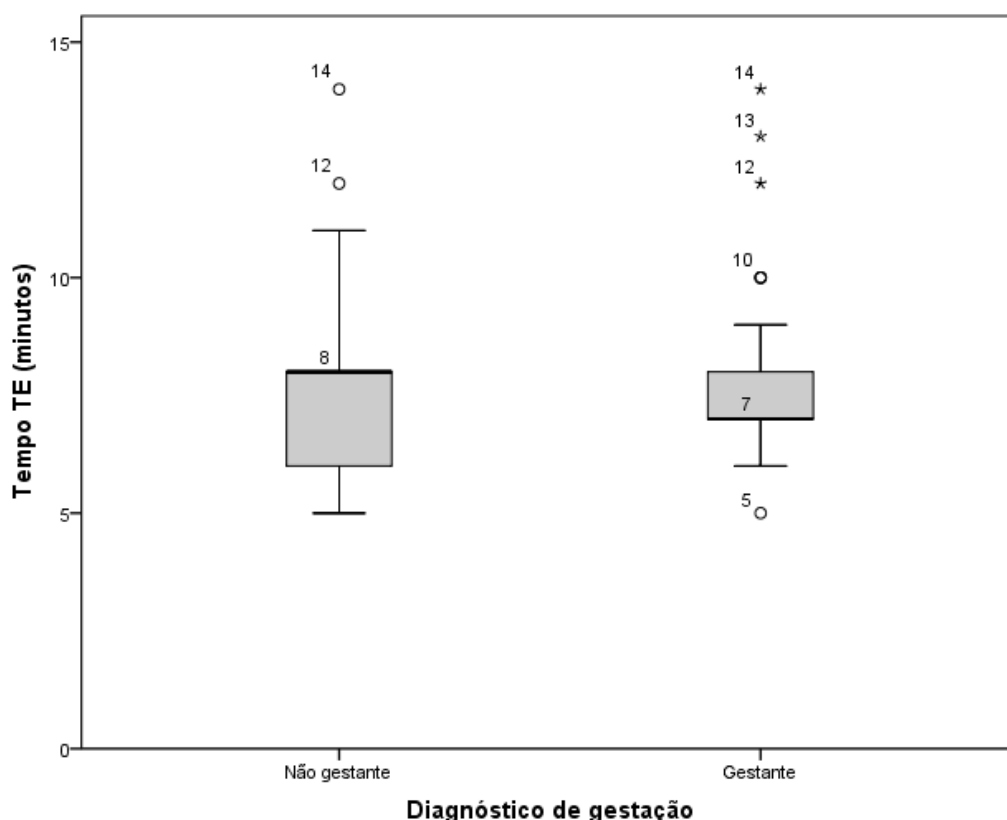
4.3.3. Relação entre o tempo de TE e o DG

Na tabela 11, é possível avaliar os valores do tempo de TE, que compreende o tempo entre o início do procedimento de descongelação e o final da TE. O teste utilizado foi o teste de Mann-Whitney U, obtendo-se um $p=0.273$. Não foram encontradas diferenças significativas entre grupos gestantes.

Tabela 11. Tempo de TE.

| Variáveis | N | Média | Mediana | Máximo | Mínimo | DP |
|-----------------------|----|-------|---------|--------|--------|------|
| Tempo de TE (minutos) | 97 | 7,75 | 8 | 14 | 5 | 1,69 |

Gráfico 1. Relação entre o tempo de TE e o DG.



No Gráfico 1 é possível observar-se a distribuição do tempo de TE em função do DG. Apesar de haver alguns “outliers” no grupo gestante, é possível verificar que a maior parte das TE que resultaram em gestação situaram-se no intervalo de tempo entre 7 a 8 minutos, com um tempo mediano de 7 minutos, ao invés do grupo não gestante que registou uma maior dispersão dos resultados com tempo mediano de 8 minutos.

4.4. DISCUSSÃO

O processo de congelação-descongelação de embriões provoca uma redução da TG pós-TE de aproximadamente 8,5 a 14 %, relativamente ao registado com embriões frescos. Esta redução deve-se, provavelmente, a alterações nas células trofoblásticas causados por aquele processamento (Hasler, 2001; Spell et al., 2001). Essas lesões podem afectar o desenvolvimento embrionário e promover uma diminuição na produção de IFN- τ durante o RMG. Nesta altura a P₄ desempenha um papel fundamental (Diskin & Morris, 2008), sendo responsável pela criação de um ambiente propício ao desenvolvimento embrionário e as suas elevadas concentrações são potenciadoras de maiores produções de IFN- τ (Mann et al., 1999; Carter et al., 2008).

No presente estudo não foi possível a determinação das concentrações plasmáticas de P_4 em momentos-chave das receptoras. A mesma, teria sido proveitosa para uma completa avaliação dos resultados. Por motivos financeiros e de logística deste ensaio tal não foi possível. Convém, no entanto, reter que as estratégias que têm por objectivo a elevação da concentração plasmática de P_4 durante a fase lútea podem não afectar a TG, quando esta é, naturalmente, superior a 60% (Marques et al., 2011).

Nos bovinos, a TG para embriões descongelados é de aproximadamente 50-60% (The Merck Veterinary Manual Online, 2012). Equipas de TE francesas e canadianas reconhecidas têm obtido TG com embriões frescos que rondam os 60% (Tabela 12). Com esses valores existe apenas uma pequena margem para melhoria, se os ensaios forem conduzidos com cuidado acrescido (Thibier, 2005).

Tabela 12. Taxas de gestação médias de TE *in vivo*. Adaptado de Thibier (2005).

| Tipo de embrião | TG (%) | N | Referências citadas por Thibier, 2005 |
|----------------------|--------|-------|---------------------------------------|
| Frescos | 60 | - | Nibart & Humblot, 1997 |
| | 60,8 | 23569 | Mapletoft, 2002 |
| Descongelados | 50 | - | Nibart & Humblot, 1997 |
| | 48 | 8042 | Mapletoft, 2002 |
| | 59,7 | 23158 | Humblot, 2001 |

No presente ensaio a TG indicada na Tabela 10, para o grupo sem tratamento, foi superior à das equipas anteriormente referidas, corroborando valores também atingidos por Hasler, (2001) e Chagas e Silva (2009). Porém, não foram atingidos os valores publicados por Spell et al. (2001).

Relativamente à análise estatística dos resultados deste trabalho, não foram obtidos resultados significativamente diferentes em qualquer das hipóteses em avaliação. A relação estatística entre grupo tratado *versus* não tratado também não foi significativa.

Foi utilizado o teste exacto de Fisher bilateral, em vez do teste qui-quadrado, pelo facto de a amostra em análise ser reduzida e permitir o estudo estatístico com maior precisão do que o teste de qui-quadrado.

Quanto ao tempo de TE e a sua potencial relação com a TG, alguns autores sugerem que existe uma correlação negativa entre o tempo de manipulação do cérvix e cornos uterinos e

a TG (Selk, 2004; Farin et al., 2007), mas neste ensaio não foi possível chegar a um resultado estatisticamente significativo.

4.4.1. Grupo tratado com hCG D6 e a melhoria da TG

No presente trabalho o tratamento com hCGD6 (n=18) não foi melhorou a TG, tendo mesmo revelado uma TG numericamente inferior (9,1% menos que o grupo controlo), ao contrário do que observaram Nishigai et al. (2002) e Wallace et al. (2011). Nos estudos referidos, a dose utilizada variou entre as 1000 UI e as 1500 UI e o dia da administração do fármaco entre o D1 e o D7.

Alguns autores sugerem que a administração desta hormona, entre o 4º e o 7º dia pós IA, induz uma melhoria da TG, por contribuir efectivamente para o aumento das concentrações de P₄ (Santos et al., 2001). É bem conhecido que o tratamento entre o 4º e o 7º dia pós cio com GnRH, LH ou hCG estimula a ovulação do FD da primeira onda folicular, levando à formação de um CL acessório (Santos et al., 2001; Nishigai et al., 2002). A produção adicional de P₄ provoca a estimulação de secreções pelas glândulas endometriais, proporcionando a formação de um microambiente favorável ao desenvolvimento embrionário. Embriões de maiores dimensões têm maior capacidade de produção de IFN- τ e de bloqueio da síntese de PGF_{2 α} , factores que podem levar à manutenção da gestação (Rossetti et al., 2011).

Chagas e Silva & Lopes da Costa (2005) verificaram que as receptoras tratadas com hCG ao dia 7, e que formavam CL acessório, revelaram uma TG superior às não tratadas e às tratadas sem CL acessório. Pode-se especular, para o presente estudo, que a dose de hCG administrada (1500 UI) não terá sido suficiente para a indução de um CL acessório num número adequado de receptoras. Tal situação, por motivos logísticos, não foi avaliada.

Por seu turno, Nishigai et al. (2002) referiram que a administração da hCG, 24 horas antes da TE, revelou melhores resultados por, possivelmente, atenuar o potencial estrogénico do FD presente no momento da TE, o que pode afectar negativamente o RMG. Neste ensaio, o resultado obtido não confirma o daqueles autores, provavelmente pela dimensão da amostra tratada.

4.4.2. Grupos tratados com meloxicam (D6 e D14) e a melhoria da TG

No presente trabalho especulou-se sobre qual seria o contributo do meloxicam para a melhoria da TG antes e após a TE. Tal como já foi referido, não existiu relação estatisticamente significativa nos dois grupos tratados com meloxicam, provavelmente, e uma vez mais, dado o pequeno tamanho da amostra. No entanto, o grupo Meloxicam D6 foi

o que numericamente registou melhor TG. Poderá especular-se que, apesar de não ter sido admitida qualquer TE traumática ou deficiente na colocação do embrião, este fármaco, quando administrado ao dia 6, poderá ter revelado algum efeito benéfico (propriedade anti-inflamatória) sobre a TG, relativamente a prováveis efeitos deletérios da manipulação do trato genital, durante a transferência. Como ficou provado no estudo de Odensvik et al (1993), citados por McNaughtan (2004), a TG de algumas receptoras poderá ficar comprometida caso a manipulação do útero eleve os níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lúmen uterino. De facto, mesmo uma manipulação cuidada pode surtir esse efeito (Wann & Randel, 1990). Quando a libertação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é elevada, após a TE, poderá interferir com o desenvolvimento embrionário e afectar a qualidade do embrião (Scenna et al., 2005). Estes últimos autores também concluíram que a administração de um inibidor de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento da TE melhorava a TG das receptoras tratadas, sobretudo quando foi usado num grupo onde foram transferidos embriões de qualidade 2 (razoável).

Quanto ao resultado da TG do grupo Meloxicam D14, ele ficou um pouco abaixo do grupo controlo. Tal como num estudo publicado recentemente (Erdem & Guzeloglu, 2010), parece razoável referir que a razão para o decréscimo da TG no grupo tratado no D14 pode estar relacionada com a longa inibição da actividade da COX-2 promovida pelo meloxicam (Hirsch & Philipp, 2009). Esta actividade de inibição, poderá ter interferido com os processos de pré-implantação embrionária (Erdem & Guzeloglu, 2010).

Os resultados obtidos por Erdem e Guzeloglu (2010), e os de outros autores que usaram a FM (Purcell et al., 2005; Rossetti et al., 2011), levam a sugerir que durante o momento do RMG existe um conjunto de alterações rápidas e importantes no útero. Dada a menor duração da inibição da actividade da COX-2 promovida pela FM naquele período, foi registada uma atenuação da taxa de ME, provavelmente por esse fármaco actuar o tempo necessário para haver inibição da luteólise, mas não tão longo que se estenda até ao início do processo de implantação. Assim, a longa duração de inibição da COX-2, por si só, parece poder ser causa de ME.

O objectivo deste estudo, com a administração de um inibidor selectivo da actividade da COX-2 ao dia 14, foi o de esperar que o mesmo atenuasse a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ próximo do período crítico do RMG, sem suprimir totalmente actividade da COX-2. Como já foi referido, num estudo *in vitro* conduzido Asselin et al. (1997) concluiu-se que o aumento da produção de PGE_2 observado em cultura de células do endométrio está correlacionado com a indução específica da COX-2, mas não da COX-1. Sabe-se pois que a PGE_2 , para além de produzir efeitos sistémicos, também pode actuar como agente luteotrófico ou antiluteolítico (Pratt et al., 1995).

Concluiu-se assim que os efeitos directos e indirectos do meloxicam sobre o meio uterino e o embrião não são favoráveis, pelo menos durante a primeira fase da gestação em bovinos. Contudo, podemos afirmar que, apesar de os resultados estatísticos deste grupo não terem sido os melhores, a TG obtida foi digna de registo (Guzeloglu & Erdem, 2006; Erdem & Guzeloglu, 2010)

4.4.3. Tempo de TE e a TG

Alguns autores referiram haver uma correlação negativa entre o tempo de manipulação do trato genital e a TG (Selk, 2004; Farin et al., 2007). Como já foi mencionado anteriormente, a TG poderá ser afectada caso as manipulações do útero elevem o níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$, interferindo com o saudável desenvolvimento embrionário (Odensvik et al., 1993, citados por McNaughtan, 2004; Scenna et al., 2005). Assim como caso haja lesão do endométrio durante a progressão da cânula de transferência, com conseqüente hemorragia, o embrião provavelmente não sobreviverá (Seidel Jr & Seidel, 1991; Selk, 2004; Mapletoft, 2006).

Neste estudo é possível verificar que a maior parte das TE ocorreram num tempo mediano de 7 minutos e todas elas foram classificadas como atraumáticas e com BCE. Provavelmente, por isso, não foi demonstrada qualquer relação estatisticamente significativa entre o tempo dispendido na TE e a TG.

4.4.4. Considerações finais

Numa publicação recente concluiu-se que o problema de aplicar métodos estatísticos a diferenças observadas nas TG entre o grupo tratado e o controlo para um nível de significância de $P < 0,05$, com base no poder de amostragem de força 0,9 e com uma TG de 60-70% para dois grupos distintos, usando um teste de “two-tailed”, era o de tornar necessário um número de transferências de 496 por cada grupo. Embora o incremento da TG em 10 pontos percentuais por uma equipa de TE comercial possa ser economicamente muito favorável, torna-se muito desafiante e dispendioso desenhar estudos práticos de campo, de forma a demonstrar diferenças dessa magnitude (Chapman & Seidel, 2008 citados por Hasler, 2010b).

“A ausência de evidência não é o mesmo que a evidência de ausência” (Altman & Bland, 1995).

4.4.5. Crítica

Apesar de os valores TG terem sido favoráveis, os resultados estatísticos não tiveram a expressão que as especulações intelectuais faziam prever. Assim, o autor aponta como possíveis limitações ao presente trabalho: a reduzida amostragem do estudo; não ter sido possível determinar as concentrações plasmáticas de P_4 , E_2 e dos metabolitos da $PGF_{2\alpha}$, em momentos-chave das receptoras; não ter sido possível obter todos os dados individuais dos animais pertencentes aos diferentes grupos (p. ex., idade, peso e CC). As potenciais soluções seriam financeiras, considerando a necessidade de um laboratório de endocrinologia no arquipélago. Contudo, é de saudar toda a disponibilidade do Orientador para o fornecimento de todos os registos e auxílio na resolução dos problemas encontrados.

4.5. CONCLUSÃO FINAL

Os grupos tratados com meloxicam no D6 e D14 produziram resultados de TG percentualmente favoráveis, contudo a análise estatística não revelou qualquer significância. Relativamente ao grupo sujeito ao tratamento com hCG no D6, obteve-se a TG numericamente mais baixa, mas, de igual forma, não se encontrou significância estatística. Quanto ao tempo de TE e a sua relação com a TG a análise estatística não foi significativa, apesar de o valor mediano para o total dos animais gestantes ter sido evidenciado (7 min). Em síntese, e como pouco se poderá efectivamente concluir, com base na análise estatística, acerca do uso destes fármacos na TE e a sua influência nos índices reprodutivos analisados, outros estudos prospectivos deverão ser realizados com uma amostra maior e com um desenho experimental mais completo, para se avaliar com maior eficácia a eventual diferença entre os vários esquemas de tratamento agora abordados.

V. ANEXOS

5.1. FOTOGRAFIAS DE ESTÁGIO E TABELA

Figura 5. Cirurgia correctiva. Deslocamento do abomaso. Aveiro. Original do autor



Figura 6. Colocação de "chin-ball" em touro Nelore. São Paulo. Original do autor



Figura 7. Ecografia reprodutiva em novilha Nelore. São Paulo.
Original do autor



Figura 8. Observação de embriões à lupa. Ilha Graciosa. Original do autor.



Tabela 13. Calendário de OMTE e sincronização. Baseado no programa de OMTE realizado por Chagas e Silva (2012) na ilha Graciosa.

| DIA | AM | PM |
|--------|---|---|
| Dia 0 | 08:00 h: 2mL de PGF _{2α} às Receptoras | - |
| Dia 2 | 08:00 h: Colocação de CIDR [®] e 2mL de GnRH às Dadoras | - |
| Dia 9 | 08:00 h: (4 mL FSH +1 mL SF) às Dadoras | 20:00 h: (4 mL FSH +1 mL SF) às Dadoras |
| Dia 10 | 08:00 h: (3 mL FSH +2 mL SF) às Dadoras | 20:00 h: (3 mL FSH +2 mL SF) às Dadoras |
| Dia 11 | 08:00 h: (2 mL FSH +3 mL SF) às Dadoras 08:00 h: 2mL de PGF _{2α} às Receptoras | 20:00 h: (2 mL FSH +3 mL de SF) às Dadoras |
| Dia 12 | 08:00 h: Remoção de CIDR [®] e 2 mL de PGF _{2α} às Dadoras 08:00 h: (1 mL FSH +4 mL SF) às Dadoras | 20:00 h: (1 mL FSH +4 mL SF) às Dadoras Início de detecção de cios às Dadoras e Receptoras |
| Dia 13 | Detecção de cios às Dadoras e Receptoras. | 1ª IA às Dadoras (12 h após os primeiros sinais de cio) Detecção de cios às Dadoras e Receptoras |
| Dia 14 | 2ª IA às Dadoras (12 horas após a 1ª IA) Detecção de cios às Receptoras | |
| Dia 20 | Recolha de embriões às Dadoras; TE para as Receptoras e CE dos excedentários | |
| Dia 55 | DG às Receptoras (perfazendo 35 dias de gestação) | |

Legenda. FSH (Pluset, LaboratóriosCalier, Espanha); SF (Soro Fisiológico); IA (Inseminação Artificial); TE (Transferência de embriões); CE (Congelação de embriões); DG (Diagnóstico de gestação).

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Matsuzaki, S. & Hoshi, H. (2002). Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology* , 57, pp. 1273-1283.
- Adams, G. P., Kot, K., Smith, C. A. & Guinther, O. J. (1993). Effect of dominant follicle on regression of its subordinates. *Canadian Journal of Animal Science* , 73, pp. 267-275.
- Adams, G. P. (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle; implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* , 41, pp. 19-24.
- Adams, G. P. (1999). Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* , 54, pp. 17-32.
- Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J.L Malhi, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* , 69, pp. 72-80.
- Alcivar, A. A., Maurer, R. R. & Anderson, L. L. (1992). Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle-stimulating hormone (fsh-p) or human menopausal gonadotropin. *Journal of Animal Science* , 70, pp. 224-231.
- Alkemade, S. J., Murphy, B. D. & Mapletoft, R. J. (1993). Superovulation in the cow; effects of biological activity of gonadotropins. *Proceedings of Annual Meeting of American Embryo Association*. Maine.
- Altman, D. G. & Bland, J. M. (1995). Absence of evidence is not evidence of absence. *British Medical Journal* , 311, p. 485.
- Ambrose, J. D., Pires, M. F., Moreira, F., Diaz, T., Binelli, M. & Thatcher, W. W. (1998). Influence of deslorelin (gnrh-agonist) implant on plasma progesterone, first wave dominant follicle and pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* , 50, pp. 1157-1170.
- Ambrose, J. D., Drost, M., Monson, R. L., Rutledge, J. J., Leibfried-Rutledge, M. L., Thatcher, M. J. et al. (1999). Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *Journal of Dairy Science* , 82, pp. 2369-2376.
- Anjum, A. I., Usmani, R. H., Tunio, M. T. & Abro, S. H. (2009). Improvement of concepiton rate in crossbred cattle by using gnrh analogue therapy. *Pakistan Veterinary Journal* , 29, pp. 93-94.
- Araujo, R. R., Ginther, O. J., Ferreira, J. C., Palhao, M. M., Beg, M. A. & Wiltbank, M. C. (2009). Role of follicular estradiol-17 beta in timing of luteolysis in heifers. *Biology of Reproduction* , 81, pp. 426-437.
- Arnold, D. A., Binelli, M., Vonk, J., Alexenco, A. P., Drost, M. & Thatcher, W. W. (1999). Intracellular regulation of endometrial pgf2alpha production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon-tau. *Domestic Animal Endocrinology* , 18, pp. 199-216.
- Asselin, E., Lacroix, D. & Fortier, M. A. (1997). Ifn-tau increases pge2 production and cox-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Molecular Cellular Endocrinology* , 132, pp. 117-126.

- Auletta, F. J. & Flint, A. P. (1988). Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non human primates corpus luteum function in sheep, cows, non human primates. *Endocrine Reviews* , 9, pp. 88-105.
- Ax, R. L., Armbrust, S., Tappan, R., Gilbert, G., Oyarzo, J. N., Bellin, M. E. et al. (2005). Superovulation and embryo recovery from peripubertal holstein heifers. *Animal Reproduction Science* , 85, pp. 71-80.
- Bajaj, N. K. (2001). *Effect of herbal medication on endometritis in buffaloes*. India: Gujarat Agricultural University.
- Balaguer, S. A., Pershing, R. A., Rodriguez-Sallaberry, C., Thatcher, W. W. & Badinga, L. (2005). Effects of bovine somatotropin on uterine genes related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* , 88, pp. 543-552.
- Barros, C. M., Newton, G. R., Thatcher, W. W., Drost, M., Plante, C. & Hansen, P. J. (1992). The effect of bovine interferon alpha 1 on pregnancy rate in heifers. *Journal of Animal Science* , 70, p. 1471.
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N., Guimenes, L. U., Sá Filho, M. F., Martins, C. M. et al. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* , 76, pp. 1583-1593.
- Beal, W. E., Hinshaw, R. H. & Whitman, S. S. (1998). Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. *Theriogenology* , 49, p. 241.
- Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M. G., Roche, J. F. & Crowe, M. A. (2009). Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology* , 71, pp. 1173-1179.
- Beretta, C., Garavaglia, G. & Cavalli, M. (2005). Cox-1 and cox-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. *Pharmacological Research* , 52, pp. 302-306.
- Bergfelt, D. R., Bo, G. P., Mapletoft, R. J. & Adams, G. P. (1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrus cycle in cattle. *Animal Reproduction Science* , 49, pp. 1-12.
- Betteridge, K. J. & Loskutoff, N. M. (1993). Prospects for improving the survival rate of transferred embryos. *Molecular Reproduction and Development* , 36, pp. 262-265.
- Betteridge, K. J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science* , 79, pp. 203-244.
- Bilodeau-Goeseels, S. & Kastelic, J. P. (2012). Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Canadian Journal of Animal Science* , 83, pp. 659-671.
- Binelli, M. & Thatcher, W. W. (1999). Conceptus-stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. *Annual Review of Biomedical Sciences* , 1, pp. 59-85.
- Binelli, M., Thatcher, W. W., Mattos, R. & Baruselli, P. S. (2001). Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* , 56, pp. 1451-1463.

- Binelli, M., Machado, R., Bergamaschi, A. C., da Silva, J. C., Ibiapina, B. T. & Bisinotto, R. S. (2006). Conceitos e aplicações de estratégias antiluteolíticas visando o incremento da taxa de concepção em bovinos. *2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, (pp. 93-100). Londrina.
- Block, J. & Hansen, P. J. (2007). Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating cows. *Theriogenology*, 67, pp. 1518-1529.
- Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D. & Hansen, P. J. (2008). Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocyst produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, pp. 895-903.
- Blum, J. W., Dosogene, H., Hoeben, D., Vangroenweghe, H. M., Bruckmaier, R. M. & Burvenich, C. (2000). Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by escherichia coli infection and endotoxin in dairy cows. *Domestic Animals Endocrinology*, 19, pp. 2230-2235.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., Tribulo, H. E., Caccia, M. & Mapletoft, R. J. (1994). Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41, pp. 1555-1569.
- Bó, G. A., Hockley, D. K., Nasser, L. F. & Mapletoft, R. J. (1994). Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. *Theriogenology*, 42, pp. 963-975.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A. & Mapletoft, R. J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43, pp. 31-40.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R. A. & Mapletoft, R. J. (1995). Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, 39, pp. 193-204.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R. et al. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57, pp. 53-72.
- Bó, G. A., Peres, L. C., Cutaia, L. E., Pincinato, D., Baruselli, P. S. & Mapletoft, R. J. (2012). Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction Fertility and Development*, 24, pp. 272-277.
- Boland, M. P., Goulding, D. & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35, pp. 5-17.
- Boland, M. P., Lonergan, P. & O' Callaghan, D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, pp. 1323-1340.
- Bondoc, O. L., Smith, C. & Gibson, J. P. (1989). A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developing countries. *Animal Breeding Abstracts*, 57, pp. 819-829.

- Bowen, R. A., Elsdon, R. P. & Seidel, G. E. (1978). Embryo transfer for cows with reproductive problems. *Journal of American Veterinary Medical Association* , 172, pp. 1303– 1307.
- Brusveen, D. J., Cunha, A. P., Silva, C. D., Cunha, P. M., Sterry, R. A., Silva, E. P. et al. (2008). Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* , 91, pp. 1044–1052.
- Bungarts, L. & Niemann, H. (1994). Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by single ultrasound examination. *Journal of Reproduction and Fertility* , 101, pp. 583-591.
- Burke, J. M., Staples, C. R., Risco, C. A., De La Rota, R. L. & Thatcher, W. W. (1997). Effects of feeding a ruminant grade Menhaden fish meal on reproductive performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* , 80, pp. 3386-3398.
- Burns, P. D., Graf, G. A., Hayes, S. H. & Silvia, W. J. (1997). Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF2 alpha synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. *Domestic Animals Endocrinology* , 14, pp. 181-191.
- Butler, W. R. & Smith, R. D. (1989). Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* , 72, pp. 767-783.
- Butler, W. R. (2005). Relationship of Dietary Protein and Fertility. *Advances in Dairy Technology*, (pp. 159-168).
- Byrne, A. T., Southgate, J., Brison, D. R. & Leese, H. J. (2002). Effects of insulin-like growth factors I and II on tumour-necrosis-factor- α -induced apoptosis in early murine embryos. *Reproduction Fertility and Development* , 14, pp. 79-83.
- Campos-Chillón, L. F., Suh, T. K., Barcelo-Fimbres, M., Seidel Jr, G. E. & Carnevale, E. M. (2009). Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology* , 71, pp. 349-354.
- Canada, N., Rocha, A., Meireles, C. S. & Correia da Costa, J. M. (2002). Neosporose em Portugal e novos métodos de diagnóstico e isolamento do parasita [Bovine Neosporosis in Portugal and new methods of diagnosis and isolation of the parasite]. *Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002]*, (pp. 139-148). Oeiras.
- Cardoso, R. C., Oba, E., Cardoso, B. L., Alves, B. F., Oliveira, E. R. & Fernandes, C. A. (2009). Influence of flunixin meglumine at the time of embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *II International Symposium on Animal Biology of Reproduction*, (p. 294). São Paulo.
- Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M. A. et al. (2008). Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction Fertility and Development* , 20, pp. 368-375.
- Castro e Paula, L. A. (2003). *As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos : o papel da ocitocina na produção de da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF2 α* . São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Castro Neto, A. S., Sanches, B. V., Binelli, M. & Seneda, M. M. (2005). Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology* , 63, pp. 1249–1255.

- Chagas e Silva, J. N. (1991). Ovulação múltipla e transferência de embriões em bovinos. *II encontro dos Médicos Veterinários da beira interior*, (pp. 1-25). Guarda.
- Chagas e Silva, J. N., Cidadao, M. R. & Costa, J. A. (1993). Selection of Friesian cows as recipients of fresh and frozen embryos on the basis of blood progesterone concentration. *Proceedings of the 5th International Symposium on Animal Reproduction*, 2, pp. 67-74. Luso, Portugal.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L. & Robalo Silva, J. (2002). Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Animal Reproduction Science*, 69, pp. 1-8.
- Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L. & Robalo Silva, J. (2002). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, pp. 51-59.
- Chagas e Silva, J. & Lopes da Costa, L. (2005). Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology*, 64, pp. 49-60.
- Chagas e Silva, J. N. (2007). *Ovulação múltipla e transferência embrionária em ruminantes de aptidão leiteira em Portugal*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa - UTL.
- Chagas e Silva, J., Diniz, P. & Lopes da Costa, L. (2008). Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. *Animal Reproduction Science*, 104, pp. 18-27.
- Chagas e Silva, J. (2009). Transferência embrionária em bovinos leiteiros na Ilha Graciosa (Açores): Programa experimental de transferência de embriões sexados e congelados da raça Holstein Frísia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 104, pp. 469-572.
- Chapman, P. L. & Seidel, G. E. (2008). Experimental design, power and sample size for animal reproduction experiments. *Reproduction Fertility and Development*, 20, pp. 33-44.
- Chebel, R. C., Santos, J. E., Reynolds, J. P., Cerri, R. L., Juchem, S. O. & Overton, M. (2004). Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 84, pp. 239-255.
- Chebel, R. C. (2007). Mastitis effects on reproduction. *National Mastitis Council Regional Meeting Proceedings*, (pp. 43-55). USA.
- Chebel, R. C., Demétrio, D. G. & Metzger, J. (2008). Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69, pp. 98-106.
- Cheng, Z., Sheldrick, E. L., Marshall, E., Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. & Flint, A. P. (2007). Control of cyclic AMP concentration in bovine endometrial stromal cells by arachidonic acid. *Reproduction*, 133, pp. 1017-1026.
- Christensen, J. O., Grummer, R. R., Rasmussen, F. E. & Bertrics, S. J. (2004). Effect of method of delivery of propyleneglycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. *Journal of Dairy Science*, 80, pp. 664-676.
- Christianson, W. T. (1992). Stillbirths mummies abortions and early embryonic death. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 8, pp. 623-639.

- Danet-Desnoyers, G., Wetzels, C. & Thatcher, W. W. (1994). Natural and recombinant bovine interferon regulate basal and oxytocin-induced secretion of PGF₂α and PGE₂ by endometrial epithelial and stromal cells. *Reproduction Fertility and Development* , 6, pp. 193-202.
- Demetrio, D. G., Santos, R. M., Demetrio, C. G. & Vasconcelos, J. L. (2007). Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science* , 90, pp. 5073–5082.
- Dieleman, S. J., Bevers, M. M., Vos, P. L. & de Loos, F. A. (1993). PMSG/anti-PMSG in cattle: A simple and efficient superovulatory treatment. *Theriogenology* , 39, pp. 25-42.
- Diskin, M. G., Murphy, J. J. & Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* , 96, pp. 297-311.
- Diskin, M. G. & Morris, D. G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals* , 43, pp. 260-267.
- Diskin, M. G., Parr, M. H. & Morris, D. G. (2012). Embryo death in cattle: an update. *Reproduction Fertility and Development* , 24, pp. 244-251.
- Dobson, H. & Smith, R. F. (1995). Stress and reproduction in farm animals. *Journal of Reproduction and Fertility* , 49, pp. 451-461.
- Donaldson, L. E. & Ward, D. N. (1987). LH effects on superovulation and fertilization rates. *Theriogenology* , 27, p. 225.
- Douglas, W. S. (1998). Use of GnRH to enhance pregnancy rates and shorten the postpartum interestrus interval in dairy cattle. *Ohio Veterinary Newsletter* , 25, pp. 4-6.
- Dransfield, M. B., Nebel, R. L., Pearson, R. E. & Warnick, L. D. (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by radiotelemetric estrus detection system. *Journal Dairy Science* , 81, pp. 1874-1882.
- Dunbar, B. S. (1983). Morphological, biochemical and immuno-chemical characterization of the mammalian zona pellucida. In J. F. Hartman (Ed.), *Mechanisms and Control of Animal Fertilization* (pp. 139–175). New York: Academic Press.
- Dunne, L. D., Diskin, M. D. & Sreenan, J. M. (2000). Embryo fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science* , 58, pp. 39-44.
- Durocher, J., Morin, N. & Blondin, P. (2006). Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in commercial operation. *Theriogenology* , 65, pp. 102-115.
- Ealy, A. D., Drost, M. & Hansen, P. J. (1993). Development changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal of Dairy Science* , 76, pp. 2899-2905.
- Elli, M., Gaffuri, B., Frigerio, A., Zanardelli, M., Covini, D., Candiani, M. et al. (2001). Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction* , 121, pp. 151-154.

- Elsden, R. P., Nelson, L. D. & Seidel, G. E. (1978). Superovulation of cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* , 9, pp. 17-26.
- Elsden, R. P., Nelson, L. & Seidel, G. E. (1979). Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Theriogenology* , 11, pp. 17-25.
- EMA. (1999). *Meloxicam (extension to bovine milk)*. London: The European Medical Agency.
- Erdem, H. & Guzeloglu, A. (2010). Effect of Meloxicam Treatment during Early Pregnancy in Holstein heifers. *Reproduction of Domestic Animals* , 45, pp. 625-628.
- Evans, B. R. (1998). the prospect for international regulatory interventions in embryo transfer and reproductive technologies in the next century. *Theriogenology* , 51, pp. 71-80.
- Faber, D. C. & Ferré, L. B. (2004). Advancements in Reproductive Technology in Cattle. 5-15.
- FAO. (2010). *FAO Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetic Resources*. Itália: FAO.
- Farin, P. W., Moore, K. & Drost, M. (2007). Assisted Reproductive. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (p. 497). Missouri, USA: Elsevier.
- Folman, Y., Kaim, M., Herz, Z. & Rosemberg, M. (1990). Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of Progesterone and Parity on Conception1. *Journal of Dairy Science* , 73, pp. 2817-2825.
- Forde, N., Carter, F., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Sandra, O., Mansouri-Attia, N. et al. (2011). Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biology of Reproduction* , 85, pp. 144-156.
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* , 50, pp. 225-232.
- Gaines, J. D. (1994). The use of gonadotropin releasing hormone and prostaglandin for programmed breeding of dairy cattle. *Proceeding of Society for Theriogenology*, (pp. 108-120).
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S. et al. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology* , 59, pp. 599-616.
- Gard, J. A., Givens, M. D., D., M. M., Galik, P. K., P., R. K., A., S. D. et al. (2009). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single in vivo-derived and in vitro-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. *Theriogenology* , 71, pp. 1238-1244.
- Geisert, R. D., Zavy, M. T., Biggers, B. G., Garrett, J. E. & Wettemann, R. P. (1988). Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Animal Reproduction Science* , 16, pp. 11-25.
- Givens, M. D. & Marley, M. S. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* , 70, pp. 1-16.

- Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, T. D., Murphy, B. D. & Mapletoft, R. J. (1994a). Increased ovulation rates in PMSD-stimulated beef heifers treated with monoclonal PMSD antibody. *Theriogenology* , 41, pp. 519-529.
- Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, D. T., Murphy, B. D. & Mapletoft, R. J. (1994b). Superovulation in cow with pregnant mare serum gonadotrophin. Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Canadian Veterinary Journal* , 35, pp. 158-162.
- González, F., Calero, P. & Beckers, J. F. (2001). Induction of Superovulation in domestic ruminants. *Kluwer Academic Publishers* , 209-223.
- Gordon, I. (2002). In I. Gordon, *Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes* (pp. 245-316). New York: Cab International.
- Gordon, I. (2004). Embryo transfer. In I. Gordon, *Reproductive technologies in farm animals* (p. 107). Oxfordshire, UK: CAB International.
- Gordon, I. (2004). *Reproductive Technologies in Farm Animals*. Oxfordshire: CABI Publishing.
- Gordon, I. (1994). Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In I. Gordon, *Laboratory Production of Cattle Embryos* (pp. 293-328). Wallingford, UK: CAB international.
- Goulding, D., Williams, D. H., Roche, J. F. & Boland, M. P. (1996). Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology* , 45, pp. 765-773.
- Gray, C. A., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Bazer, F. W. & Spencer, T. E. (2002). Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* , 124, pp. 289-300.
- Green, M. P., Hunter, M. G. & Mann, G. E. (2005). Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Animal Reproduction Science* , 88, pp. 179-189.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Høier, R. & Assey, R. (1995). The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* , 43, pp. 41-50.
- Grimes, J. F. (2008). Utilization of Embryo Transfer in Beef Cattle. *Fact Sheet Agriculture and Natural Resources* (pp. 1-5). Ohio: Ohio State University.
- Groebner, A. E., Rubio-Aliaga, I., Schulke, K., Reichenbach, H. D., Daniel, H., Wolf, E. et al. (2011). Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. *Reproduction* , 141, pp. 685-695.
- Guibalt, L. A., Grasso, F., Lussier, J. G., Rouillier, P. & Matton, P. (1991). Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *Journal of Reproduction and Fertility* , 91, pp. 81-89.
- Gurevich, M. & Shemesh, M. (1994). Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by the bovine pre-embryos. *Reproduction Fertility and Development* , 6, pp. 687-691.
- Guzeloglu, A. & Erdem, H. (2006). 161 Effect of Meloxicam Treatment on pregnancy rates in holstein heifers. *Reproduction Fertility and Development* , 19, pp. 197-198.

- Guzeloglu, A., Erdem, H., Saribay, M. K., Thatcher, W. W. & Tekeli, T. (2007). Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in holstein heifers. *Veterinary Research* , 160, pp. 404-406.
- Hamilton, C. K., Combe, A., Caudle, J., Ashkar, F. A., Macaulay, A. D., Blondin, P. et al. (2012). A novel approach to sexing the bovine blastocysts using male-specific gene expression. *Theriogenology* , 77, pp. 1587–1596.
- Hansen, L. B. (2000). Consequences of selection for milk yield from geneticist's viewpoint. *Journal of Dairy Science* , 83, pp. 1145-1150.
- Hansen, P. J. (2002). Embryo mortality in cattle from the embryo's perspective. *Journal of Animal Science* , 80, pp. 33-44.
- Hansen, P. J., Jousan, F. D. & Block, J. (2004a). Embryo transfer that works: embryo transfer as a tool for improving fertility during heat stress. *Proceedings 2004 Florida Dairy Production Road Show*. Gainesville: 59-67.
- Hansen, P. J., Soto, P. & Natzke, R. P. (2004b). Mastitis and fertility in cattle- possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology* , 51, pp. 294-301.
- Hasler, J. F., McCauley, A. D., Schermerhorn, E. C. & Foote, R. H. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* , 19, pp. 83-99.
- Hasler, J. F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* , 56, pp. 1401-1415.
- Hasler, J. F., Bilby, C. R., Collier, R. J., Denham, S. C. & Lucy, M. C. (2003). Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in commercial embryo transfer program. *Theriogenology* , 59, pp. 1919-1928.
- Hasler, J. F. (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science* , 79, pp. 245-264.
- Hasler, J. F. (2004). Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. *Proceedings of the WBC Congress, Québec, Canada* .
- Hasler, J. F. (2006). The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology* , 65, pp. 4-16.
- Hasler, J. F. (2010a). Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? *Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings*. Nashville.
- Hasler, J. F. (2010b). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development* , 22, pp. 119-125.
- Heape, W. (1897b). Further note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster- mother. *Proceedings of the Royal Society of London* , 48, pp. 178-183.
- Heape, W. (1891). Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster- mother. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* , 48, pp. 457-458.

- Herrier, A., Einspanier, R., Schams, D. & Niemann, H. (1994). Effect of a recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology* , 41, pp. 601-611.
- Hidalgo, C. O., Gómez, E., Prieto, L., Duque, P., Goyache, F., Fernández, L. et al. (2004). Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. *Theriogenology* , 62, pp. 664-676.
- Hirsch, A. C. & Philipp, H. (2009). Effects of meloxicam on reproduction parameters in dairy cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* , 32, pp. 566-570.
- Horan, B., Mee, J. F., Rath, M., O'Connor, P. & Dillon, P. (2004). The effect of strain of holstein-friesian cow and feeding system on reproductive performance in seasonal-calving milk production systems. *Animal Science* , 79, pp. 453-467.
- Humblot, P. (2001). Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* , 56, pp. 1417-1433.
- Ingerowski, G. H., Scheutwinkel-Reich, M. & Stan, H. J. (1981). Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with salmonella/microsome test. *Mutation Research* , 91, pp. 93-98.
- Inskip, E. K. (2004). Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science* , 82, pp. 24-39.
- Ireland, J. L., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P., Ward, F., Lonergan, P. et al. (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction* , 79, pp. 1219-1225.
- Jones, A. L. & Lamb, G. C. (2008). Nutrition, synchronization, and management of beef embryo recipients. *Theriogenology* , 69, pp. 107-115.
- Kafi, M. & McGowan, M. R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science* , 48, pp. 137-157.
- Kastelic, J. P. & Ginther, O. J. (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Animal Reproduction Science* , 26, pp. 13-24.
- Keller, D. S. & Teepker, G. (1990). The effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *Journal of Dairy Science* , 73, pp. 549-554.
- Kelling, C. L. (2007). Viral Diseases of the Fetus. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfael, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 399-408). Missouri: Saunders.
- Kelly, P., Duffy, P., Roche, J. F. & Boland, M. P. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science* , 46, pp. 1-14.

- Kenyon, A. G., Lopes Jr, G., Mendonça, L. G., Lima, J. R., Bruno, R. G., Denicol, A. C. et al. (2012). Ovarian responses and embryo survival in recipient lactating Holstein cows treated with equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 77, pp. 400-411.
- Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, L. E. & Walton, J. S. (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47, pp. 703-714.
- King, K. K., Seidel Jr, G. E. & Elsden, R. P. (1985). Bovine embryo transfer pregnancies I. Abortion rates and characteristics. *Journal of Animal Science*, 61, pp. 747-757.
- Knijn, H. M. (2011). National statistical data of embryo transfer activity in Europe for 2010. *27th Annual Meeting A.E.T.E.* (pp. 13-61). Chester, England.
- Korzekwa, A., Murakami, S., Wocławek-Potocka, I., Bah, M. M., Okuda, K. & Skarzynski, D. J. (2008). The influence of tumor necrosis TNF- α on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptors expression during the estrous cycle. *Reproductive Biology*, 8, pp. 245-261.
- Lala, P. K. (1990). Interruption of murine pregnancy by activation of antigennon-specific killer cells in the endometrium with indomethacin, high dose IL-2 or a combination. *Research in Immunology*, 141, pp. 159-167.
- Larson, J. E. (2011). *Embryo Transfer in the Dairy Herd*. Mississippi.
- Larson, M. A., Kimura, K., Kubisch, H. M. & Roberts, R. M. (2001). Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proceedings National Academic Science*, (pp. 9677-9682). USA.
- Lazzari, G. & Galli, C. (1993). In vitro embryo production from valuable cows slaughtered for reproductive failure or terminal illness. *Proceedings of the report of the 9th scientific meeting of the European Embryo Transfer Association*, (pp. 87-99).
- Lazzari, G. & Galli, C. (1996). In vitro embryo production and its application to cattle breeding. *Proceedings of the report of the 12th scientific meeting of the European Embryo Transfer Association*, (pp. 73-82).
- Leibo, S. P. & Mapletoft, R. J. (1998). Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. *Proceedings Annual Meeting American Embryo Transfer Association*, (pp. 91-98). San Antonio.
- Leibo, S. P. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69, pp. 37-47.
- Leroy, J. L., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T. & Gossens, L. (2005). Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, 64, pp. 2022-2036.
- Leroy, J. L., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. & Bols, P. E. (2008). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and

- embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* , 43, pp. 612-622.
- Leung, S. T., Derecka, K., Man, G. E., Flint, A. P. & Watches, D. C. (2000). Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* , 119, pp. 25-33.
- Lewis, G. S. (1989). Prostaglandin secretion by the blastocyst. *Journal of Reproduction and Fertility* , 37, pp. 261-267.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P. M., Pintado, B., de la Fuente, J. et al. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* , 69, pp. 1424-1431.
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* , 76, pp. 1594-1601.
- Looney, C. R., Nelson, J. S., Schneider, H. J. & Forrest, D. W. (2006). Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* , 65, pp. 201-209.
- Lopes da Costa, L., Chagas e Silva, J. & Robalo Silva, J. (2001). Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology* , 56, pp. 65-77.
- Lopez-Gaitus, F., Santolaria, P., Yaniz, J. L. & Hunter, R. H. (2004). Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding cattle. *Theriogenology* , 62, pp. 1529-1535.
- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L. & Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science* , 70, pp. 3615-3626.
- Lucy, M. C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science* , 83, pp. 1635-1647.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science* , 84, pp. 1277-1293.
- Lucy, M. C. (2002). Reproductive loss in farm animals during heat stress. *Proceedings 15th American Meteorological Society Biological Systems and Aero Meeting*, (pp. 50-53).
- Lussier, J. G., Lamothe, P. & Pacholek, X. (1995). Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* , 43, p. 270.
- Lyytinen, H., Pukkala, E. & Ylikorkala, O. (2009). Breast cancer risk in postmenopausal women using estradiol-progestogen therapy. *Obstetrics & Gynecology* , 113, pp. 65-73.
- Machado, R., Bergamaschi, M. A., Barbosa, R. T., de Oliveira, C. A. & Binelli, M. (2008). Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. *Theriogenology* , 69, pp. 798-804.

- Machado, R., Bergamaschi, M. A., da Silva, J. C. & Binelli, M. (2010). *Estratégias para reduzir a mortalidade embrionária em bovinos: II. Protocolo para reduzir a mortalidade embrionária em vacas de leite e em receptoras de embrião*. São Paulo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Maciel, M., Gustafsson, H. & Rodriguez-Martinez, F. (1995). Superovulatory response in lactating cows with different follicular dynamics. *Journal of Veterinary Medicine* , 42, pp. 123-129.
- Macmillan, K. L., Taufa, V. K., Day, A. M. & Peterson, A. J. (1991). Effects of supplemental progesterone on pregnancy rates in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* , 43, p. 304.
- Macmillan, K. L. (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* , 56, pp. 42-47.
- Makarevich, A. V., Kubovicova, E., Popelkova, M., Fabian, D., Cikos, S., Pivko, J. et al. (2010). Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. *Zygote* , 18, pp. 145-153.
- Mann, G. E. & Picton, H. M. (1995). Ovarian and uterine effects of a single buserelin injection on day 12 of the oestrus cycle in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* , 15, p. 23 (Abstract).
- Mann, G. E. & Lamming, G. E. (1995). Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. *Journal of Reproduction and Fertility* , 104, pp. 1-5.
- Mann, G. E. & Lamming, G. E. (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* , 34, pp. 269-274.
- Mann, G. E., Lamming, G. E., Robinson, R. S. & Wathes, D. C. (1999). The regulation of interferon tau production and uterine receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* , 54, pp. 317-328.
- Mann, G. E. & Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* , 121, pp. 175-180.
- Mann, G. E., Fray, M. D. & Lamming, G. E. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *The Veterinary Journal* , 171, pp. 500-503.
- Mantovani, A. P., Reis, E. L., Gacek, F., Bó, G. A., Binelli, M. & Baruselli, P. S. (2005). Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR) for induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. *Animal Reproduction* , 2, pp. 272-277.
- Mapletoft, R. J. (1986). Embryo transfer in the cow. In D. A. Morrow (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology II* (pp. 54-63). Philadelphia: WB Saunders.
- Mapletoft, R. J. & Pierson, R. A. (1993). Factors affecting superovulation in the cow: Practical considerations. *Embryo Transfer Newsletter* , pp. 15-24.
- Mapletoft, R. J. (2002). *Personnal communication*.
- Mapletoft, R. J., Steward, K. B. & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation of cattle. *Reproduction Nutritional Development* , 42, pp. 1-11.

- Mapletoft, R. J. & Hasler, J. F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Scientific and Technical Review - International Office of Epizootics* , 24, pp. 393-403.
- Mapletoft, R. J. (2006). Bovine Embryo transfer. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine* .
- Mapletoft, R. J. & Bó, G. A. (2012). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction Fertility and Development* , 24, pp. 278–283.
- Marques, M. O., Nasser, L. F., Bo, G. A., Sá Filho, M. F., Reis, E. L., Binelli, M. et al. (2011). *Follicular dynamics and pregnancy rates in bos taurus x bos indicus embryo recipients treated to increase plasma progesterone concentrations*. São Paulo : FMVZ - USP (Artigo não publicado).
- Martinez, F., Kaabi, M., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C. et al. (2004). Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology* , 42, pp. 1264-1270.
- Martinez, M. F., Adams, G. P., Bergfelt, D., Kastelic, J. P. & Mapletoft, R. J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Animal Reproduction Science* , 57, pp. 23-33.
- Martinez, M. F., Kastelic, J. P., Adams, G. P., Cook, R. B., Olson, W. O. & Mapletoft, R. J. (2002). The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology* , 57, pp. 1049-1059.
- Martins, I. S., Ferreira, M. M., Rosa, B. R. & Benedette, M. F. (2008). Laminite Bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* , 10, pp. 1-5.
- Mattos, R., Staples, C. R. & Thatcher, W. W. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of Reproduction* , 5, pp. 38-45.
- McNaughtan, J. (2004). *The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients*. Australia: Brigham Young University.
- Merrill, M. L., Ansotegui, R. P., Burns, P. D., Macneil, M. D. & Geary, T. W. (2007). Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *Journal of Animal Science* , 85, pp. 1547-1554.
- Meyer, M. D., Hansen, P. J., Thatcher, W. W., Drost, M., Badinga, L., Roberts, R. M. et al. (1995). Extension of corpus luteum life span and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha of cows in response to recombinant interferon tau. *Journal of Dairy Science* , 78, pp. 1921-1931.
- Miyamoto, Y., Skarzynski, D. J. & Okuda, K. (2000). Is tumour necrosis factor α a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F2 alpha release at luteolysis in cattle? *Biology of Reproduction* , 62, pp. 1109-1115.
- Moenter, S. M., Caraty, A. & Karsch, F. J. (1990). The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology* , 127, pp. 1375-1384.
- Mollo, A., Lora, M., Faustini, M., Romagnoli, S. & Cairoli, F. (2007). Some Factors Affecting Embryo Transfer Success in Dairy Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances* , 6, pp. 496-499.

- Momont, H. W. & Seguin, B. E. (1984). Influence of the day of estrus cycle on response to PGF₂alpha products: implications for AI programs for dairy cattle. *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction*, 3, p. 336 (Abstract).
- Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19, pp. 55-82.
- Moor, R. M., Kruip, T. A. & Green, D. (1984). Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology*, 21, pp. 103-116.
- Moore, D. A. & Ishler, V. (1997). Managing dairy cows during the transition period: focus on ketosis. *Veterinary Medicine*, 92, pp. 1061-1072.
- Moore, K. & Thatcher, W. W. (2006). Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, pp. 1254-1266.
- Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C. & Thatcher, W. W. (2002a). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57, pp. 1371-1387.
- Moreira, F., Paula-Lopes, F. F., Hansen, P. J., Badinga, L. & Thatcher, W. W. (2002b). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 57, pp. 895-907.
- Moura, M. T., Marques, M. O., Frare, J., Madureira, E. H., Bó, G. A. & Baruselli, P. S. (2001). Sincronização da ovulação com Crestar e CIDR para inovação de embriões bovinos em tempo fixo. *4º Simpósio Internacional de Reproducción Animal*, (p. 269 Abstract).
- Murphy, B. D. & Martinuk, S. D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, 12, pp. 24-44.
- Mussard, M. L., Burke, C. R., Behlke, E. J., Gasser, C. L. & Day, M. L. (2007). Influence of premature induction of luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. *Journal of Animal Science*, 85, pp. 937-943.
- Nasser, L. F., Reis, E. L., Oliveira, M. A., Bó, G. A. & Baruselli, P. S. (2004). Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine ET in bos indicus X bos taurus recipients. *Theriogenology*, 62, pp. 1577-1584.
- Nibart, M. & Humblot, T. P. (1997). Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Proceedings of the Annual conference of International Embryo Transfer Society (IETS)*. 43, p. 371. France: Theriogenology.
- Nicholas, F. W. & Smith, C. (1983). Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. *Anim. Prod*, 36-341.
- Nicholas, F. W. (1996). Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science*, 42, pp. 205-214.
- Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T. & Kaneda, Y. (2002). Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 58, pp. 1597-1606 Abstract.

- Nomenclature, C. o. (1972). *Recommendations for standardizing bovine reproductive terms*. 216-237: Cornell .
- Odensvik, K., Duchens, M. & Gustafsson, H. (1993). Does mechanical manipulation of the reproductive organs cause a prostaglandin release in the heifer during embryo transfer? *Acta Veterinaria Scandinavica* , 219-221.
- Odensvik, K., Gustafsson, H. & Kindahl, H. (1998). The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Animal Reproduction Science* , 50, pp. 35-44.
- Palasz, A. T. & Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances* , 14, pp. 127 – 149.
- Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J. & Fortier, M. A. (2002). Expression of microsomal prostaglandin e synthase in bovine endometrium: Coexpression with Cyclooxygenase Type 2 and Regulation by Interferon- τ . *Endocrinology* , 143, pp. 2936–2943.
- Parent, M., Madore, E., MacLaren, L. A. & Fortier, M. A. (2006). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase in the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction* , 131, pp. 573-582.
- Pate, J. L. & Keyes, L. P. (2001). Immune cells in the corpus luteum: friends or foes. *Reproduction* , 122, pp. 665-676.
- Pellegrino, C. A., Henry, M., Jacomini, J. O. & Diniz, E. G. (2003). Aplicações da mensuração da resistência elétrica do muco vaginal no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* , 27, pp. 660-668.
- Perry, G. (2004). The Bovine Estros Cycle. *Cooperative Extension Service - USDA*. South Dakota.
- Pettit, W. H. (1985). Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. *Theriogenology* , 23, pp. 13-16.
- Pierson, R. A. & Guinther, O. J. (1984). Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* , 21, pp. 495-504.
- Poyser, N. L. (1995). The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* , 53, pp. 147-195.
- Pratt, B. R., Butcher, R. L. & Inskeep, E. K. (1995). Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGF_{2 α} in ewes. *Journal of Animal Science* , 45, pp. 784–791.
- Pritchard, J. Y., Schrick, F. N. & Inskeep, E. K. (1994). Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology* , 42, pp. 247-259.
- Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C. & Mao, I. L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* , 86, pp. 125-135.
- Pugh, M. L., Pence, M., Caamano, J. N., Robbe, S., Timms, L. L., Omson, J. U. et al. (1999). The use of vaginal conductivity probe to influence calf sex ratio via altered insemination time. *Beef Research Report* , 28, pp. 112-120.

- Purcell, S. H., Beal, W. E. & Gray, K. R. (2005). Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology* , 64, pp. 867-878.
- Pursley, J. R., Mee, M. O. & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* , 44, pp. 915-923.
- Rajamahendran, R. & Calder, M. D. (1993). Superovulatory responses in dairy cow following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology* , 40, pp. 99-109.
- Rhoads, M. L., Field, M. E., Cossel, S. E., Li, X., Bilby, T. R., Collier, R. J. et al. (2010). *Reproduction and Hormones that Regulate Energy Balance*. The University of Arizona.
- Riddell, K. P. & Stringfellow, D. A. (1998). The use of antibiotics in media for recovery, culture and storage of embryos. In D. A. Stringfellow & S. M. Seidel (Edits.), *Manual of the International Embryo Transfer Society* (pp. 85-91).
- Riollet, C., Rainard, P. & Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Dairy Science* , 84, pp. 1077-1084.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P. & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* , 61, pp. 234-248.
- Roberts, R. M., Ezashi, T., Rosenfeld, C. S., Ealy, A. D. & Kubisch, H. M. (2003). Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. *Reproduction Supplement* , 61, pp. 239-251.
- Robinson, R. W., Mann, G. E., Lamming, G. E. & Wathes, D. C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and pregnancy in cows. *Reproduction* , 122, pp. 965-979.
- Robinson, R. S., Fray, M. D., Wathes, D. C., Lamming, G. E. & Mann, G. E. (2006). In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Molecular Reproduction and Development* , 73, pp. 470-474.
- Robinson, R. S., Hammond, A. J., Wathes, D. C., Hunter, M. G. & Mann, G. E. (2008). Corpus Luteum-Endometrium-Embryo Interactions in the Dairy Cow: Underlying Mechanisms and Clinical Relevance. *Reproduction in Domestic Animals* , 43, pp. 104-112.
- Roche, J. F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* , 96, pp. 282-296.
- Rodrigues, C. A., Teixeira, A. A., Ferreira, R. M., Ayres, H., Mancilha, R. F., Souza, A. H. et al. (2010). Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Animal Reproduction Science* , 118, pp. 110-117.
- Rodrigues, P. B. (2011). *Estudo de alguns aspectos da criopreservação de embriões bovinos da raça Frísia Holstein na rotina de uma unidade de transferência de embriões*. Lisboa.

- Rodriguez-Martinez, H., Hultgren, J., Båge, R., Bergqvist, A. S., Svensson, C., Bergsten, C. et al. (2008). Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? *IVIS Reviews in veterinary Medicine*.
- Rossetti, R. C., Perdigão, A., Mesquita, F. S., Sá Filho, M., Nogueira, G. P., Machado, R. et al. (2011). Effects of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and/or human chorionic gonadotropin on pregnancy rates in Nelore cows. *Theriogenology*, 76, pp. 751-758.
- Rowe, R. F., Del Campo, M. R., Crister, J. K. & Guinther, O. J. (1980). Embryo transfer in cattle: nonsurgical transfer. *American Journal of Veterinary Research*, 41, pp. 1024-1028.
- Rubinstein, M., Marazzi, A. & deFried, E. P. (1999). Low-dose aspirin treatment improves ovarian blood flow velocity, implantation, and pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled assay. *Fertility and Sterility*, 71, pp. 825-829.
- Sakumoto, R., Murakami, S., Kishi, H., Iga, K., Okano, A. & Okuda, K. (2000). Tumor necrosis factor- α and its receptor in the corpus luteum of pregnant cows. *Molecular Reproduction and Development*, 55, pp. 406-411.
- Sangsritavong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Amentano, L. E. & Wiltbank, M. C. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 beta in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85, pp. 2831-2842.
- Santos, J. E., Thatcher, W. W., Pool, L. & Overton, M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, 79, pp. 2881-2894.
- Santos, J. E., Cerri, R. L., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E. & Kirk, J. H. (2004a). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 80, pp. 31-45.
- Santos, J. E., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. & Galvão, K. N. (2004b). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 83, pp. 513-535.
- Santos, J. E., Juchem, S. O., Cerri, R. L., Galvao, K. N., Chebel, R. C. & Thatcher, W. W. (2004). Effect of bst and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, pp. 868-881.
- Saragusty, J. & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, pp. 1-19.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, S., Mertens, A., Guenter, J. N., Parrish, J. & Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, 11, pp. 2803-2812.
- Sartori, R. (2004). Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, pp. 35-50.
- Sato, T., Nakada, K., Uchiyama, Y., Kimura, Y., Fujiwara, N., Sato, Y. et al. (2005). The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchhronize follicular wave on

- superstimulation of follicular growth in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development* , 51, pp. 573-578.
- Scenna, F. N., Hockett, M. E., Townsa, T. M., Saxton, A. M., Rohrbach, N. R., Wehrman, M. E. et al. (2005). Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* , pp. 38–45.
- Schmitt, E. J.-P., Diaz, T., Barros, C. M., de la Sota, R. L., Drost, M., Fredriksson, E. W. et al. (1996). Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotrophin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science* , 74, pp. 1074-1083.
- Schrack, F. N., Scenna, F. N., Edwards, J. L., Hockett, M. E. & Saxton, A. M. (2003). More evidence for direct interaction between prostaglandin F2alpha and development of bovine embryos. *Proceedings of the CETA and AETA Joint Annual Convention*, (pp. 43-52).
- Seidel, G. E. & Seidel, S. M. (1981). In B. G. Brackett, G. E. & S. M. Seidel, *New technologies in animal breeding* (pp. 41–80). Orlando: Academic Press .
- Seidel Jr, G. E. (1984). Applications of Embryo Transfer and Related Technologies to Cattle. *Journal of Dairy Science* , 67, pp. 2786-2796.
- Seidel Jr, G. E. & Seidel, S. M. (1991). *Training manual for embryo transfer in cattle*. Rome: FAO.
- Seidel Jr, G. E. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* , 65, pp. 228-235.
- Selk, G. (2004). Embryo transfer in Cattle. In O. S. Service., *Beef Cattle Manual* (4^a e 5^a ed.). Oklahoma.
- Senger, P. L. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Washington: Current Conceptions.
- Shabankareh, H. K., Zandi, M. & Ganjali, M. (2010). First service pregnancy rates following post-AI use of hCG in Ovsynch and Heatsynch programmes in lactating dairy cows. *Reproduction in domestic animals* , 45, pp. 711-716.
- Shams-Esfandabadi, N., Shirazi, A., Mirskokrai, P. & Bonyadian, M. (2007). Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 10, pp. 2709-2713.
- Shea, B. F. (1978). Recovery of bovine follicular oocytes and their fertilization in a recipient animal. *Theriogenology* , 19, pp. 9-101.
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* , 65, pp. 1516-1530.
- Sianangama, P. C. & Rajamahendran, R. (1992). Effect of human chorionic gonadotrophin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. *Theriogenology* , 38, pp. 85-96.
- Silke, V., Diskin, M. G., A., K. D., Boland, M. P., Dillon, P., Mee, J. F. et al. (2001). Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal Reproduction Science* , 71, pp. 1-12.

- Skarzynski, D. J., Bah, M. M., Woclawek-Potocka, I., Deptula, K., Korzekwa, A., Shibaya, M. et al. (2003). Roles of tumor necrosis factor alpha in regulation of estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biology of Reproduction* , 89, pp. 1907-1913.
- Skarzynski, D. J., Woclawek-Potocka, I., Korzekwa, A., Bah, M. M., Piotrowska, K., Barszczewska, B. et al. (2007). Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biology of Reproduction* , 76, pp. 619-627.
- Smith, A. K. & Grimmer, S. P. (2002). Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* , 57, pp. 2083-2091 Abstract.
- Smith, C. & Ruane, J. (1987). Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial review in dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* , pp. 985-990.
- Smith, C. (1988). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology* , 29, pp. 203-212.
- Smith, C. (1988). Genetic improvement of livestock using nucleus breeding units. *World Animal Review* , pp. 2-10.
- Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R. & Lamb, G. C. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* , 56, pp. 287-297.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W. & Burghardt, R. C. (2004a). Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* , 128, pp. 657-668.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C. & Bazer, F. W. (2004b). Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction* , 71, pp. 2-10.
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W. & Burghardt, R. C. (2007). Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *Society for Reproduction and Fertility Supplement* , 64, pp. 379-396.
- Sreenan, J. & Diskin, M. (1994). Factors affecting herd conception rate. *Irish Farmers Journal* , pp. 30-31.
- Staigmiller, R. B., Bellows, R. A., Anderson, G. B., Seidel, G. E., Foote, W. D., Menino, A. R. et al. (1992). Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology* , pp. 1091-1099.
- Staples, C. R., Burke, J. M. & Thatcher, W. W. (1998). Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *Journal of Dairy Science* , 81, pp. 856-871.
- Stevenson, J. S., Portaluppi, M. A., Tenhouse, D. E., Lloyd, A., Eborn, D. E., Kacuba, S. et al. (2007). Interventions after artificial insemination: Conception rates, pregnancy survival, and ovarian response to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science* , 90, pp. 331-340.

- Stevenson, J. S., Tiffany, S. M. & Inskeep, E. K. (2008). Maintenance of pregnancy in dairy cattle after treatment with human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Dairy Science* , 91, pp. 3092-3101.
- Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M. (1998). *Manual of International Embryo Transfer Society*. IETS.
- Stringfellow, D. A. (1998). Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In D. A. Stringfellow & S. M. Seidel (Edits.), *Manual of International Embryo Transfer Society* (3ª Edição ed., pp. 79-84).
- Stringfellow, D. A., Givens, M. D. & Waldrop, J. G. (2004). Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reproduction Fertility and Development* , 16, pp. 93-102.
- Stock, A. E. & Fortune, J. F. (1993). Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* , 132, pp. 1108-1114.
- Stroud, B. & Hasler, J. F. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* , 65, pp. 65-76.
- Struder, V. A., Grummer, S. J. & Reynolds, C. K. (1993). Effect of prepartum propylene glycol administration on periparturient fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science* , 76, pp. 2931-2939.
- Suadsong, S. (2011). Control of Oestrus and Ovulation in Cows. *Thailand Journal Veterinary Medicine Supplement* , 41, pp. 95-98.
- Subramaniam, A., Devarajan, K. P. & Mohanan, M. (1991). Repeat flushing and embryo recovery (RFER) in cross-bred donors cows (Bos indicus x Bos taurus). (Abstract). *Theriogenology* , 35, p. 277.
- Sutmoller, P. (1996). Importation of bovine genetics: a quantitative risk assessment of disease transmission by bovine embryo transfer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (pp. 296-270). New York.
- Telfer, E. E., Webb, R., Moor, R. M. & Gosden, R. G. (1999). New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. *Animal Science* , 68, p. 285.
- Tesfaye, D., Salilew-Wondim, D. & Schellander, K. (2011). The role of endometrium in bovine pregnancy establishment. *27th Annual Meeting A.E.T.E.*, (pp. 75-82). Chester.
- Thatcher, W. W., Macmillan, K. L., Hansen, P. J. & Drost, M. (1989). Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* , 31, pp. 149-164.
- Thatcher, W. W., Staples, C. R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B. & Schmitt, E. P. (1994). Embryo health and mortality in sheep and cattle. *Journal of Animal Science* , 72, pp. 16-30.
- Thatcher, W. W., Meyer, M. D. & Danet-Desnoyers, G. (1995). Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* , 49, pp. 15-28.

- Thatcher, W. W., Moreira, F., Santos, J. E., Mattos, R. C., Lopes, F. L., Pancarci, S. M. et al. (2001a). Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, pp. 75-89.
- Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T. R. & Pru, J. K. (2001b). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56, pp. 1435-1450.
- Thatcher, W. W., Moreira, F., Pancarci, S., Bartolome, J. A. & Santos, J. E. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, pp. 243-254.
- Thatcher, W. W., Guzeloglu, A., Meikle, A., Kamimura, S., Bilby, T., Kowalski, A. A. et al. (2003). Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction Supplement*, 61, pp. 253-266.
- Thatcher, W. W., Bilby, T. R., Bartolome, J. A., Silvestre, F., Staples, C. R. & Santos, J. E. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65, pp. 30-44.
- The Merck Veterinary Manual Online*. (2012). New York: Merck Sharp & Dohme Corporation.
- Thibier, M. (2001). Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. *Theriogenology*, 56, pp. 1465-1481.
- Thibier, M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction Nutrition Development*, 45, pp. 235-242.
- Townson, D. H., Tsang, P. C., Butler, W. R., Frajblat, M., Griel, L. C., Johnson, C. J. et al. (2002). Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 80, pp. 1053-1058.
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Alasino, R. V., Beltramo, D. et al. (2011). Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Animal Reproduction Science*, 129, pp. 7-13.
- Umbaugh, R. (1949). Superovulation and ovum transfer in cattle. *American Journal Research*, 295-252.
- VanRaden, P. M. & Miller, R. H. (2006). Effects of nonadditive genetic interactions, inbreeding and recessive defects on embryo and fetal loss by seventy days. *Journal of Dairy Science*, 89, pp. 2716-2721.
- Vanroose, G., de Kruif, A. & Van Soom, A. (2000). Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, 60-61, pp. 131-143.
- Velazquez, M. A., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R. & Niemann, H. (2009). The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*, 137, pp. 161-180.
- Voelkel, S. A. & Hu, Y. X. (1992). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37, pp. 23-37.
- Vos, P. L., van der Schans, A. & de Wit, A. A. (1994). Effects of neutralization of pregnant mares serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-

superovulated heifers on follicular function and development. *Journal of Reproduction and Fertility* , 100, pp. 387-393.

Wagtendonk-de Leeuw, A. M., Van den Daas, J. H. & Rall, W. F. (1997). Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* , 48, pp. 1071-1084.

Wales, R. G. & Cuneo, C. L. (1989). Morphology and chemical analysis of the sheep conceptus from the 13th to the 19th day of pregnancy. *Reproduction Fertility and Development* , 1, pp. 31-39.

Walker, A. M., Kimura, K. & Roberts, M. R. (2009). Expression of bovine interferon-tau variantes according to sex and age of conceptuses. *Theriogenology* , 72, pp. 44-53.

Wallace, L. D., Breiner, C. A., Breiner, R. A., Spell, A. R., Carter, J. A., Lamb, G. C. et al. (2011). Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology* , 75, pp. 1506–1515.

Walsh, S. W., Williams, E. J. & Evans, A. C. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* , 123, pp. 127-138.

Walton, J. S., Halbert, G. W., Robinson, N. A. & Leslie, K. E. (1990). Effects of progesterone and human chorionic gonadotrophin administration 5 days post insemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research* , 54, pp. 305-308.

Wann, R. A. & Randel, R. D. (1990). Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F2alpha in multiparous and primiparous brahman cows. *Journal of Animal Science* , 68, pp. 1389-1394.

Warwick, B. L., Berry, R. O. & Horlacher, W. R. (1934). Results of mating rams to Angora female goats. *Proceedings of the 27th Annual Meeting of the American Society of Animal Production*, (pp. 225-227).

Wathes, D. C., Reynolds, T. S., Robinson, R. S. & Stevenson, K. R. (1998). Role of the insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. *Journal of Dairy Science* , 81, pp. 1778-1789.

Wathes, D. C., Taylor, V. J., Cheng, Z. & Mann, G. E. (2003). Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility* , 61, pp. 219-237.

Willett, E., Black, W., Casida, L., Stone, W. & Buckner, P. (1951). Successful transplantation of a bovine ovum. *Science* , 113, 113-247.

Wiltbank, M. C., Lopez, H., Sartori, R. & Sangsritavong, S. &. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* , 65, pp. 17-29.

Wiltbank, M. C., Sartori, R., Herlihy, M. M., Vasconcelos, J. L., Nascimento, A. B., Souza, A. H. et al. (2011). Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* , 76, pp. 1568–1582.

- Wolf, E., Arnold, G. J., Bauersachs, S., Beier, H. M., Blum, H., Einspanier, R. et al. (2003). Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. *Reproduction in Domestic Animals* , 38, pp. 276–289.
- Yaeger, M. J. & Holler, L. D. (2007). Bacterial Causes of Bovine Infertility and Abortion. In S. R. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 389-399). Missouri: Saunders.
- Youngs, C. R. (2011). Journal of Visualized Experiments. *Cryopreservation of Preimplantation Embryos of Cattle, Sheep and Goats* .
- Zavy, M. T. (1994). *Embryonic mortality in domestic species*. (M. T. Zavy & R. D. Geisert, Edits.) Flórida: CRC Press.